

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Adnan EL FARES

SUJET:

Contribution à l'étude des mycorrhizes de l'Epicéa.
Méthodes expérimentales et influence des sols et des
litières.

Soutenue publiquement le 26 Avril 1974 devant la Commission d'Examen

JURY

MM. F. MANGENOT

Président

J. GARNIER

Y. DOMMERGUES

Examineurs

J. TIMBAL

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Adnan EL FARES

SUJET:

**Contribution à l'étude des mycorrhizes de l'Epicéa.
Méthodes expérimentales et influence des sols et des
litières.**

Soutenue publiquement le 26 Avril 1974 devant la Commission d'Examen

JURY

MM. F. MANGENOT

Président

J. GARNIER

Y. DOMMERGUES

Examineurs

J. TIMBAL

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

Par

Adnan EL FARÈS



Contribution à l'étude des mycorhizes de l'épicéa.
Méthodes expérimentales et influence des sols et des

littératures.

Bonne impression à Nancy, 1974, 100 pages, 15 francs.

1974

Président

M. A. BANGENOT

J. GARNIER

Examinateurs

P. DOMENICHINI

A. THIBAUT

AVANT-PROPOS

Avant d'exposer notre travail, nous tenons à remercier ici Monsieur le Professeur MANGENOT qui nous a proposé notre sujet et qui a suivi de très près le déroulement de nos recherches dans son laboratoire avec ses encouragements et ses conseils très clairs. Nous sommes très heureux d'assurer notre maître de notre profonde reconnaissance et de notre très sincère attachement.

Qu'il nous soit permis de remercier Monsieur le Professeur GARNIER qui a bien voulu examiner notre travail et faire partie du jury de notre thèse.

Notre reconnaissance s'adresse également à Monsieur DOMMERGUES pour l'attention qu'il a bien voulu porter à nos travaux et nous sommes très honorés de le voir compter parmi les membres du jury.

Nous exprimons nos remerciements à Monsieur TIMBAL pour sa présence dans le jury de cette thèse.

Nous remercions aussi Messieurs VENET, JACAMON et LANIER (E.N.G.R.E.F., NANCY) pour leurs enseignements et leur aide dans la connaissance de la forêt.

Nous devons également remercier Monsieur KILBERTUS pour ses fructueuses conversations.

Monsieur KIFFER n'a jamais cessé de nous aider au cours de ce travail et a toujours fait preuve de bienveillance à notre égard : qu'il en soit amicalement remercié.

Nous adressons notre gratitude à nos collègues du programme d'étude de la symbiose mycorrhizienne en particulier, Mademoiselle BAUZON et Monsieur DELATOUR pour l'aide morale qu'ils nous ont apportée et l'amitié qu'ils nous ont toujours témoignée.

Nous adressons enfin nos remerciements à tous nos camarades de laboratoire pour leur amicale collaboration.

SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I -	
ESSAIS DE CULTURE ET DE SYNTHÈSE	
I <u>OPTENTION ET CULTURES DES PLANTULES</u> <u>AXÉNIQUES</u>	3
A. Les graines d'Epicéa	4
B. Etudes des conditions de germination in vitro	6
C. Action des agents stérilisants sur le pourcentage de germination et la taille des radicelles	10
II <u>ESSAIS DE SYNTHÈSE EN CONDITIONS</u> <u>CONTROLÉES</u>	16
A. Matériel et méthodes	16

B. Champignons étudiés	20
C. Résultats et discussion	21

CHAPITRE II -

ETUDE DE MYCORRHIZES IN SITU -

I DESCRIPTION DES STATIONS	29
II COMPTAGE ET DESCRIPTION DES MYCORRHIZES	32
A. Technique	33
B. Résultats	34
III DISCUSSION ET CONCLUSIONS	47

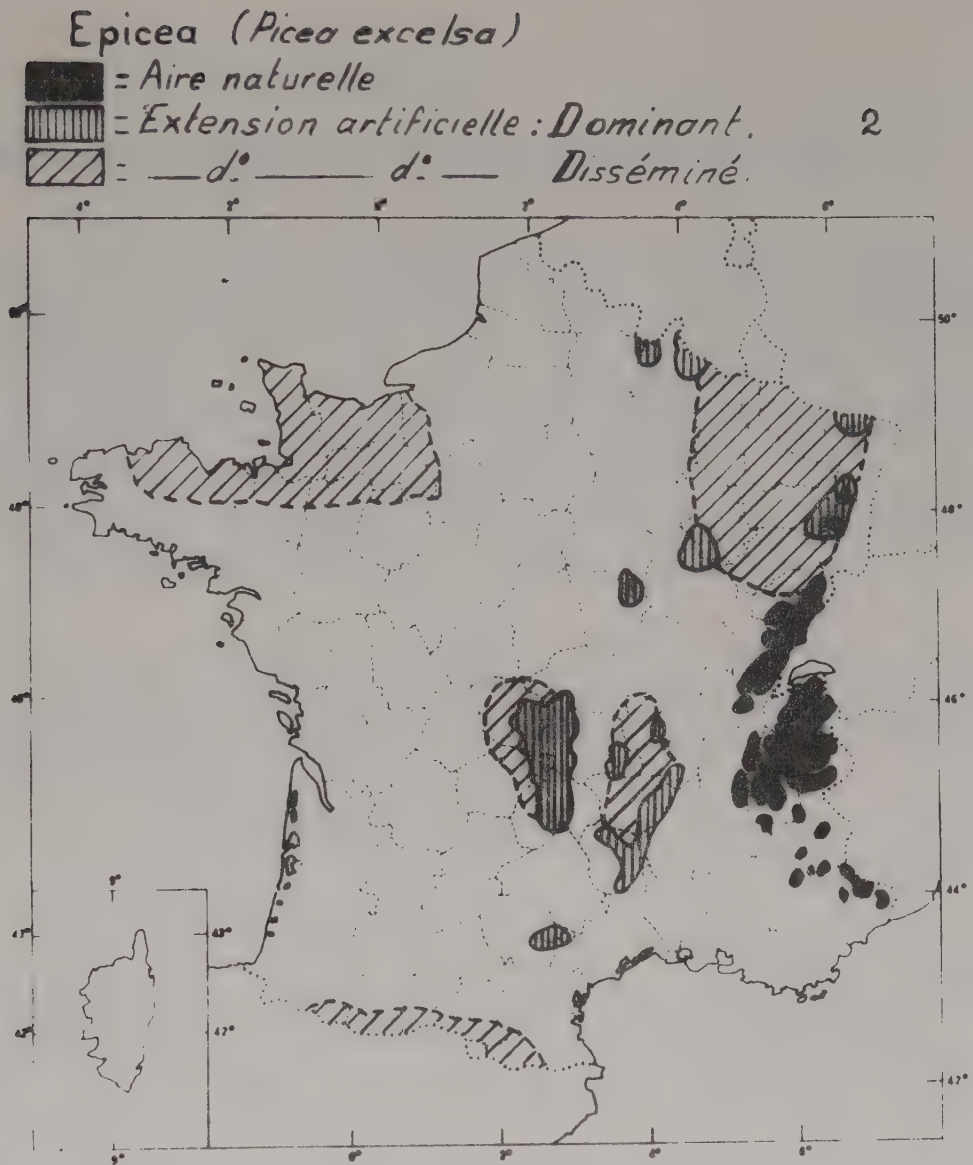
CHAPITRE III -

GERMINATION ET MYCORRHIZATION DE L'EPICEA EN FONCTION DU SUBSTRAT

I MYCORRHIZATION EN PRESENCE DE DIFFERENTS SOLS	51
A. Matériel et méthodes	51
B. Résultats et discussion	52
II INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA MYCORRHIZATION DES PLANTS D'EPICEA	53
A. Matériel et méthodes	53

B. Résultats et discussion	54
III <u>GERMINATION ET MYCORRHIZATION EN PRESENCE DE</u> <u>DIFFERENTES LITIÈRES</u>	55
A. Matériel et méthodes	56
B. Résultats et discussion	57
IV <u>GERMINATION DES GRAINES D'EPICEA IN VITRO</u>	60
A. Sur extrait des litières	60
1) matériel et méthodes	60
2) résultats	61
B. Sur différentes fractions d'extrait de Mousse	63
1) Obtention des fractions	63
2) Résultats	65
C. Sur des cultures de Champignons mycorrhiziens	65
1) matériel et méthodes	65
2) résultats	66
V <u>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</u>	
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

(Fig. 1)



d'après M. JACAMON

I N T R O D U C T I O N

A - IMPORTANCE ACTUELLE DE L'EPICEA COMMUN EN FRANCE :

A l'état naturel, l'Epicéa commun, *Picea abies* (L.) KARSTEN (= *Picea excelsa* (Lam.) LINK) se rencontre dans les moyennes et hautes montagnes, Vosges et Jura (800 à 1600m), Alpes du Nord (800 à 1 800m) ainsi que dans quelques stations particulièrement humides des Alpes du Sud (figure 1). Mais il est largement utilisé en dehors de son aire naturelle pour des opérations de reboisement : cette essence occupe 3% de la surface forestière française (12 millions d'hectares), 20 000 hectares lui sont consacrés chaque année, ce qui correspond à l'installation de 60 millions de plants (LACAZE, 1969). Cette espèce s'est imposée pour deux raisons principales :

- Sa plasticité écologique : Il s'agit d'une essence de demi-lumière, mais dont les semis supportent très bien un éclaircissement élevé ; elle résiste au froid (jusqu'à - 50° C) et notamment aux gelées de printemps. Elle s'adapte à des sols et à des roches mères variées.

La principale limitation à son emploi réside dans sa sensibilité aux chaleurs et sécheresses trop fortes.

- L'Epicéa peut devenir un arbre de très grande taille (50m) à tige très droite. Il fournit un produit très demandé, tant comme bois d'oeuvre que pour les utilisations industrielles (pâte à papier - fabrication de panneaux).

Suivant l'utilisation, les plantations peuvent être établies dans deux types de stations :

. à basse et moyenne altitude
lorsque l'objectif est la production rapide d'une grande quantité de bois ;

. à haute altitude, pour l'obtention d'un bois de qualité, en raison de l'accroissement annuel faible.

Sa souplesse écologique et sa valeur économique en font donc une essence très utilisable pour les reboisements. Cependant, le rendement d'une plantation peut varier énormément selon les conditions de milieu (DECOURT, LE TACON 1970).

B - IMPORTANCE DES MYCORRHIZES :

Ces reboisements d'*Epicea* sont effectués pour une bonne part sur des sols agricoles de valeur économique insuffisante. Avec l'utilisation de plus en plus répandue des engrais et des traitements pesticides, de la stérilisation du sol des pépinières, des contenants en matière plastique pour la culture des plantules etc..., les jeunes sujets destinés aux reboisements risquent d'être dépourvus des Champignons mycorrhiziens normalement présents dans les sols forestiers et capables de renforcer leurs possibilités d'absorption racinaire.

Il faut donc envisager de pratiquer, dans l'avenir, l'inoculation artificielle des jeunes plantules (BOULLARD 1968, MIKOLA 1969, FORTIN et PINFAU 1971).

Le choix de Champignons symbiotiques adaptés au terrain peut donner les meilleurs résultats de reboisement (MOSFER 1958). D'autre part, le rôle protecteur des Champignons mycorrhiziens contre les pathogènes n'est plus à démontrer (ZAK 1964, MARX 1969, MARX - DAVEY 1969, MARX 1973).

Dans le cadre d'un programme collectif d'étude de la symbiose mycorrhizienne, notre travail a consisté :

- 1) à mettre au point les méthodes d'obtention des plantules axéniques et de synthèse ;
- 2) à étudier quantitativement et qualitativement les mycorrhizes de deux pessières de la région de NANCY, l'une établie en sol forestier et l'autre en sol agricole.

Nous avons en outre été amenés à réaliser des essais de germination des graines et de mycorrhization des plantules en fonction du sol et de la litière qui le recouvre.

CHAPITRE I

ESSAIS DE CULTURE ET DE SYNTHESE

I - OBTENTION ET CULTURE DE PLANTULES AXENIQUES -

Introduction :

L'obtention de plantules axéniques est un préalable indispensable aux différentes expériences que nous envisageons de réaliser au laboratoire.

Pour ces différents essais, tout organisme étranger au Champignon mycorrhizien étudié doit être exclu du système expérimental. Ceci vaut même pour les saprophytes.

En effet, nous ne pouvons pas accepter la position de MOUZAIN (1971) qui considère comme axéniques les plantules hors d'atteinte des Champignons symbiotiques ou pathogènes mais poussant éventuellement en présence de saprophytes. Nous avons pu constater que ces derniers ne permettent pas une croissance normale des plantules et inhibent la croissance des Champignons mycorrhiziens étudiés. De même, GAUDRAY (1972) constate que les contaminations accidentelles empêchent la formation de mycorrhizes et même le développement dans la vermiculite du Champignon inoculé. Certaines espèces de *Penicillium* inhibent la mycorrhization de *Pinus taeda* par *Thelephora terrestris* (MARX, ROSS 1970). Inversement, SPERMANOVA (1962) et MALYSKIN (1955) (in : DAVEY 1969) ont trouvé que *Trichoderma* sp. stimule la formation de mycorrhizes.

Nous avons parfois obtenu des mycorrhizes, en particulier avec *C. graniforma* malgré des contaminations dues à *Penicillium* spp. ; cependant, nous n'avons pas pris ces plantules en considération notamment en ce qui concerne les résultats quantitatifs.

A - LES GRAINES D'EPICEA -

1) Obtention des graines :

Les graines utilisées proviennent des récoltes de la station d'amélioration des arbres forestiers du C.N.R.F. (NANCY - Amance). Ces récoltes sont effectuées en automne (septembre - novembre) par cueillette manuelle des cônes dans les 2 ou 3 mètres supérieurs des arbres porte-graines choisis. Cette cueillette doit avoir lieu entre l'époque de la maturité des graines et celle de l'ouverture des cônes. Ceux-ci sont rapportés au laboratoire, placés sur des clayettes en vue d'un premier ressuyage, puis portés au séchoir. Les cônes s'ouvrent, les graines sont alors extraites, désaillées mécaniquement et soumises à un tri densimétrique à l'éther de pétrole pour éliminer les graines vides. L'ensemble des graines provenant d'une station déterminée, ayant subi ces traitements, constituent un lot qui sera conservé au sec et au froid (+ 4 à 5° C.) jusqu'à l'utilisation.

Lorsque la station remet une partie de ces lots à un utilisateur, elle en détermine simultanément la faculté germinative.

2) Origines des graines utilisées :

La station d'amélioration nous a remis pour essai 6 lots de graines provenant de différents peuplements français d'Epicéa. Il s'agit de stations d'Epicéa autochtone sauf peut-être celle de Chapois où l'origine des arbres est controversée.

Les stations d'origine représentent donc assez bien les peuplements naturels d'Epicéa en France. Les renseignements du tableau I nous ont été aimablement communiqués par Monsieur AUBERT (C.N.R.F.) Nancy - Amance.

Toutes les graines utilisées dans nos essais de mycorrhization proviennent d'un même lot de semences provenant de Montriond.

TABLEAU I

Origine des graines utilisées

N° de la provenance	Espèce	Année de récolte	Origine
1	<i>Picea excelsa</i>	1971	Le Kertoff tout venant
2	<i>Picea excelsa</i>	1971	Chapois tout venant
3	<i>Picea excelsa</i>	1971	Montriond
4	<i>Picea excelsa</i>	1962	Massacre II
5	<i>Picea excelsa</i>	1962	Chamonix II
6	<i>Picea excelsa</i>	1968	Gérardmer IV

B - ETUDE DES CONDITIONS DE GERMINATION IN VITRO -

Nous avons réalisé une étude préliminaire en vue de déterminer les meilleures conditions d'obtention de plantules axéniques susceptibles d'une bonne croissance ultérieure. Ces essais ont porté sur les conditions de germination et sur la stérilisation superficielle des graines.

1) Germination :

Bien que les graines de l'Epicéa ne présentent pas de dormance (BONNEL - MAZIMBERT comm. pers.), nous avons essayé l'effet d'un prétraitement par immersion dans l'eau froide en vue d'obtenir des germinations plus rapides et plus abondantes.

a) Matériel et méthodes :

Les essais de prétraitement ont porté sur les six provenances mentionnées au début de ce chapitre.

Toutes les graines étaient conservées au réfrigérateur à sec à $+4^{\circ}$ - $+5^{\circ}\text{C}$.

- Trempage : un premier lot A est conservé ainsi jusqu'aux opérations de lavage exposées plus loin. Un deuxième lot B est immergé pendant deux semaines dans de l'eau distillée à $+4^{\circ}$ - $+5^{\circ}\text{C}$ en boîtes de Pétri. L'eau est renouvelée tous les deux ou trois jours.

- Lavage : les deux lots A et B sont alors soumis aux traitements suivants : immersion dans l'alcool éthylique à 70% pour éliminer les graines vides qui sont plus légères et flottent à la surface ; rinçage à l'eau distillée ensuite trempage dans une solution de teepol à 5% pendant 30 minutes. Ce traitement est destiné à éliminer les lipides.

- Rinçage abondant à l'eau distillée.

- Mise en germination : 50 graines de chaque lot sont alors séchées sur papier-filtre puis disposées par 10 en boîtes de Pétri contenant 30ml d'eau gélifiée à 2%.

Les boîtes sont observées quotidiennement, le nombre de graines germées est noté et la longueur des radicules est mesurée à la fin de l'expérience, c'est-à-dire après 12 jours.

b) Résultats :

Ils sont détaillés dans le tableau II et la figure 2. On voit que les lots se répartissent en deux groupes : 2 et 4 à pouvoir germinatif moyen et 1 - 3 - 5 et 6 à fort taux de germination. Le traitement humide n'améliore significativement le taux de germination que dans le cas des lots 1 et 5. Mais il permet toujours une levée plus rapide des graines. Après 5 jours, aucune germination nouvelle n'est observée.

Les longueurs des racines produites par les graines traitées et non traitées ne diffèrent pas significativement, cependant les racines issues des graines non traitées sont toujours légèrement plus petites que celles provenant de graines traitées; ceci est probablement dû au retard de germination des semences qui n'ont pas subi l'immersion au froid.

2) Efficacité des agents stérilisants :

De nombreuses méthodes de stérilisation superficielle ont été proposées (DELON, 1970). Dans un premier temps, nous avons essayé trois agents stérilisants : chloramine T, hypochloride de Na et hypochloride de Ca.

Nous résumons dans le tableau III les traitements auxquels sont soumis les graines.

Tableau III

Agents	Concentration	Temps/h.	Rinçage	Incubation	Résultats
Chloramine T	2%	1,45	2 fois	20°C	-
Hypochloride de Na	3,5%	1	2 fois	23°C	-
Hypochloride de Ca	3,5%	1	2 fois	23°C	-

Toutes les graines traitées par ces trois agents étaient contaminées et nous n'avons pas continué à les utiliser.

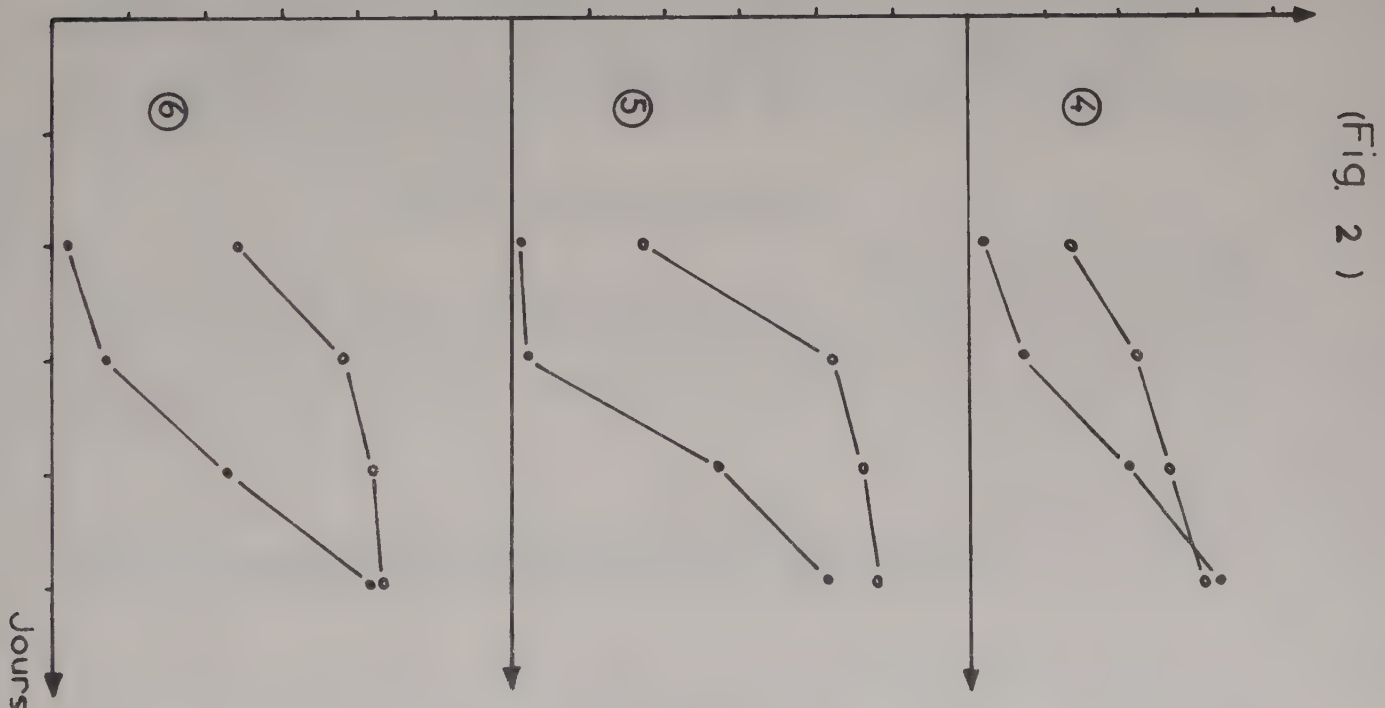
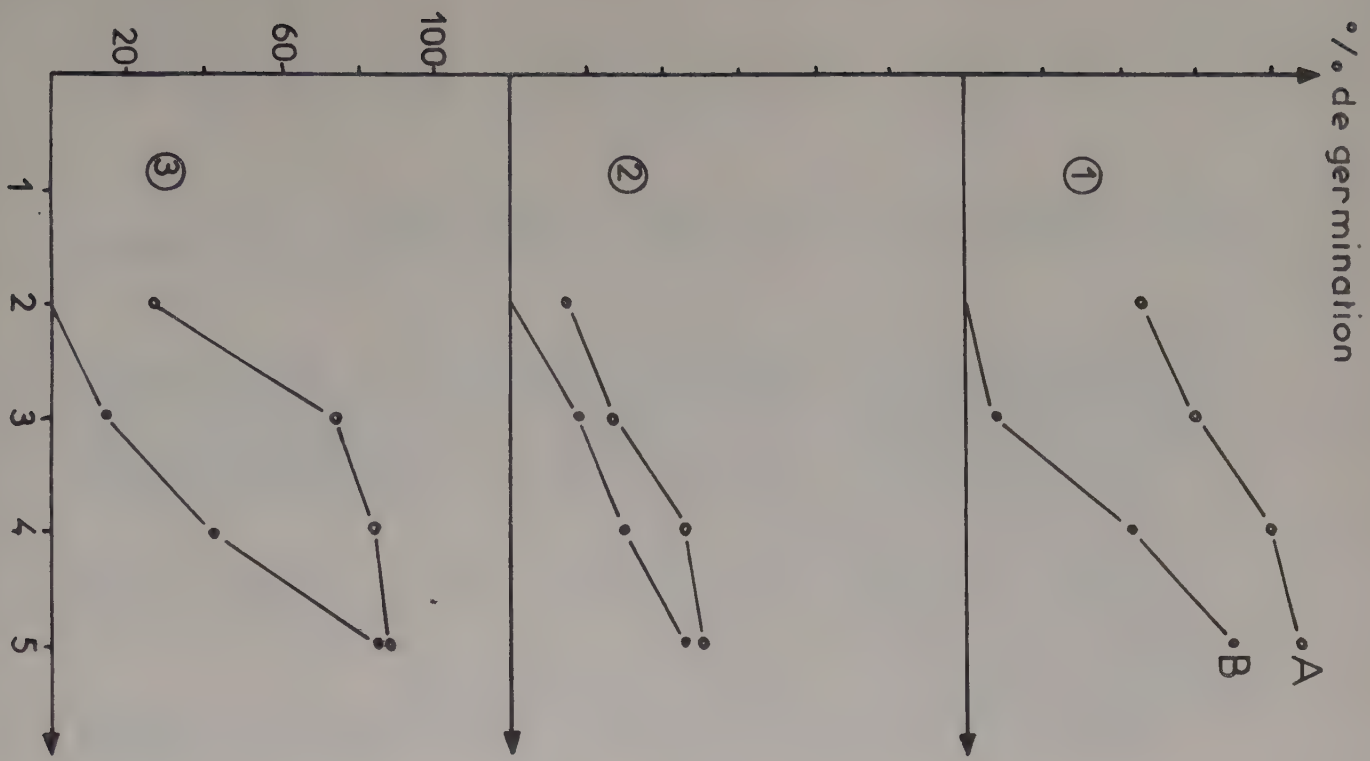
TABLEAU II

% de germination des graines d'Epicéa

Graines	Jours Traitement					
		2ème	3ème	4ème	5ème	Longueur de radicelle à 12 jours (cm)
1	A	46	60	80	88	9,8 $\pm$ 1,4
	B	0	8	44	70	7,9 $\pm$ 0,8
2	A	14	26	46	50	9,5 $\pm$ 1,1
	B	0	18	30	46	8,7 $\pm$ 0,9
3	A	26	74	84	88	9,1 $\pm$ 0,7
	B	0	14	42	86	8,3 $\pm$ 1,1
4	A	26	44	52	62	7,5 $\pm$ 1,2
	B	4	14	42	66	6,7 $\pm$ 0,8
5	A	34	84	92	96	9,8 $\pm$ 1,3
	B	2	4	54	82	7,8 $\pm$ 0,8
6	A	48	76	84	86	9,5 $\pm$ 1,0
	B	4	14	46	84	8,3 $\pm$ 1,2

A = graines prétraitées à l'eau

B = sans prétraitement



(Fig. 2)
Germination des graines d'Epicéa prétraitées à l'eau(A)
et sans prétraitement(B).

Nous avons essayé ensuite le chlorure mercurique et le peroxyde d'hydrogène :

- chlorure mercurique : il est utilisé à la concentration de 1°/∞ dans un mélange à volumes égaux d'eau distillée et d'alcool éthylique à 95%. Les graines traitées comme précédemment (voir paragraphe 1) sont immergées pendant des temps variables (de 10 secondes à 1 minute) dans la solution de $Hg\ Cl_2$, puis rincées 5 fois dans l'eau stérile.

Elles sont séchées sommairement sur papier-filtre stérile en boîte de Pétri, puis déposées par 10 sur milieu FOAGLAND gélosé, et incubées à 23°C dans l'obscurité.

Les boîtes de culture sont observées chaque jour ; le développement des Champignons est noté. Une série de témoins non stérilisés est ensemencée de la même manière. Le tableau IV et la figure 3 donnent les résultats.

- eau oxygénée : Nous avons utilisé l'eau oxygénée à 110 volumes, diluée à 30% pendant des temps allant de 15 à 60 minutes ; les graines sont ensuite rincées 2 fois à l'eau stérile, séchées et ensemencées comme précédemment. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec $Hg\ Cl_2$ dans le tableau IV et la figure 4.

Résultats et discussion :

On voit que seuls les temps de stérilisation maximum utilisés, c'est-à-dire 1 minute pour $Hg\ Cl_2$ à 1°/∞ et 1 heure pour H_2O_2 , permettent d'obtenir des graines absolument dépourvues de micro-organismes contaminants.

C - ACTION DES AGENTS STERILISANTS SUR LE POURCENTAGE DE GERMINATION ET LA TAILLE DES RADICELLES -

La stérilisation superficielle peut avoir des effets secondaires sur la germination des graines et la croissance ultérieure des plantules, soit que l'agent stérilisant pénètre à l'intérieur des téguments séminaux, soit qu'il demeure à l'état de traces sur ceux-ci. C'est pourquoi les graines utilisées pour les tests de stérilité ont été également étudiées du point de vue pourcentage de germination et longueur des radicelles. Ces essais n'ont porté que sur les graines provenant de Montriond.

TABLEAU IV

Jours	Témoin	HgCl ₂ 1g/l						H ₂ O ₂ 9%			
		Secondes						Minutes			
		10	20	30	40	50	60	15	30	45	60
1	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	70	23	10	0	0	0	0	10	3	0	0
4	90	23	13	6	3	0	0	10	3	0	0
5	90	26	16	10	6	3	0	13	6	3	0
6	93	30	16	10	6	3	0	13	6	3	0
7	96	36	16	10	6	6	0	13	10	10	0
8	100	36	16	10	6	6	0	16	10	10	0
9	100	36	16	10	6	6	0	23	10	13	0
10	100	46	23	13	13	10	0	26	13	13	0

% de graines contaminées traitées par
HgCl₂ et H₂O₂

TABLEAU V

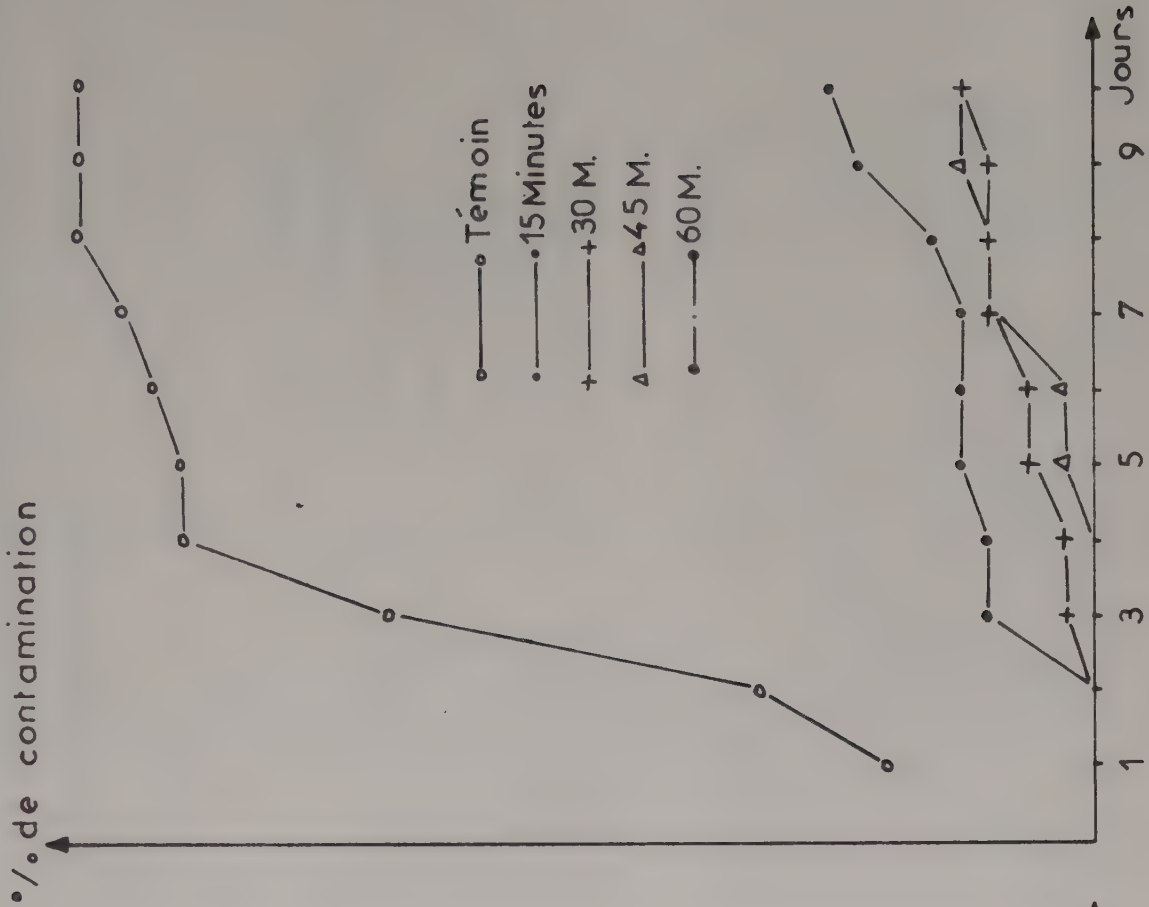
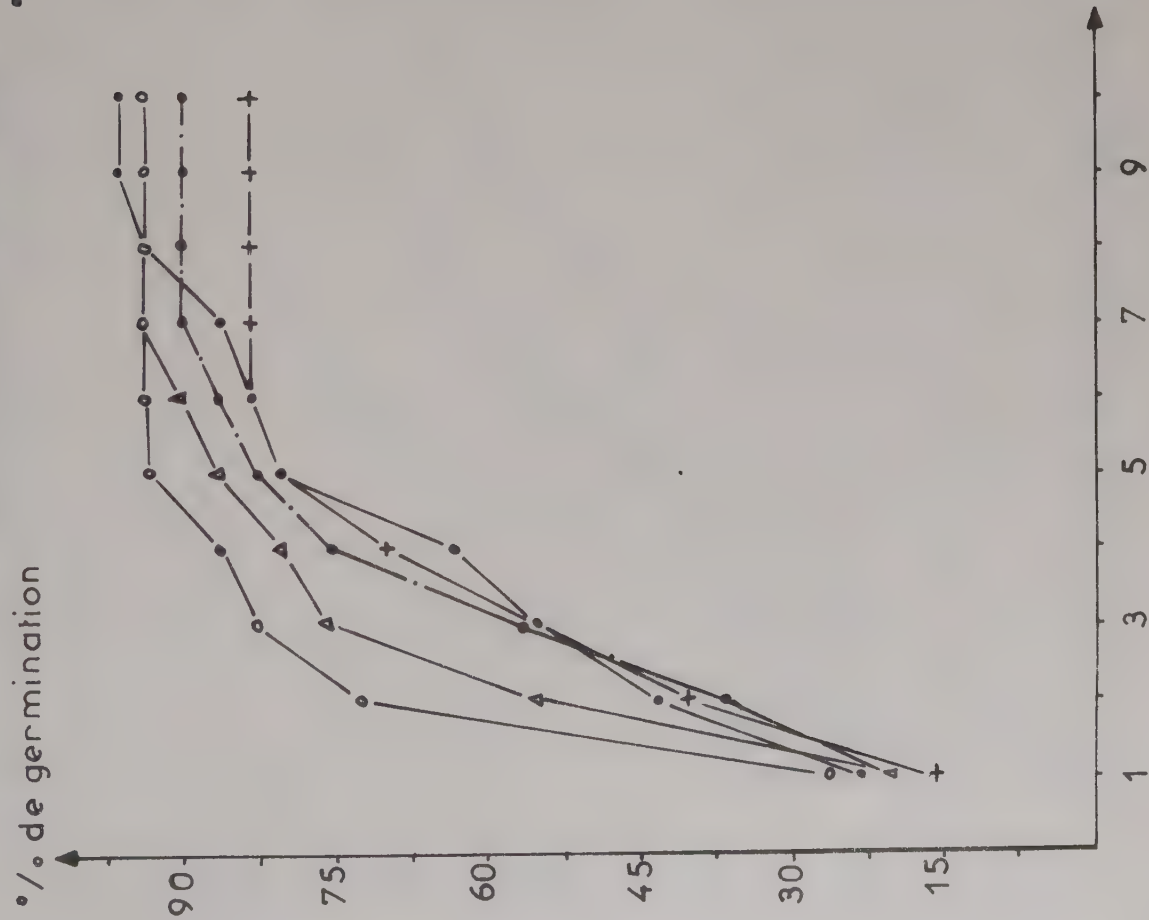
traitement		HgCl ₂						H ₂ O ₂			
	témoin	secondes						minutes			
Jours	0	10	20	30	40	50	60	15	30	45	60
1	26	26	13	16	13	10	3	23	16	20	20
2	73	36	30	23	26	10	10	43	40	55	36
3	83	60	40	30	33	23	23	55	55	76	56
4	86	76	46	43	33	30	26	63	70	80	76
5	93	86	70	63	43	40	36	80	80	86	83
6	93	90	73	73	56	50	43	83	83	90	86
7	93	90	76	80	63	56	46	86	83	93	90
8	93	93	76	80	66	66	50	93	83	93	90
9	93	93	76	80	66	66	50	93	83	93	90
10	93	93	76	80	66	66	60	96	83	93	90

% des graines germées traitées par HgCl₂ et H₂O₂

(Fig. 4)

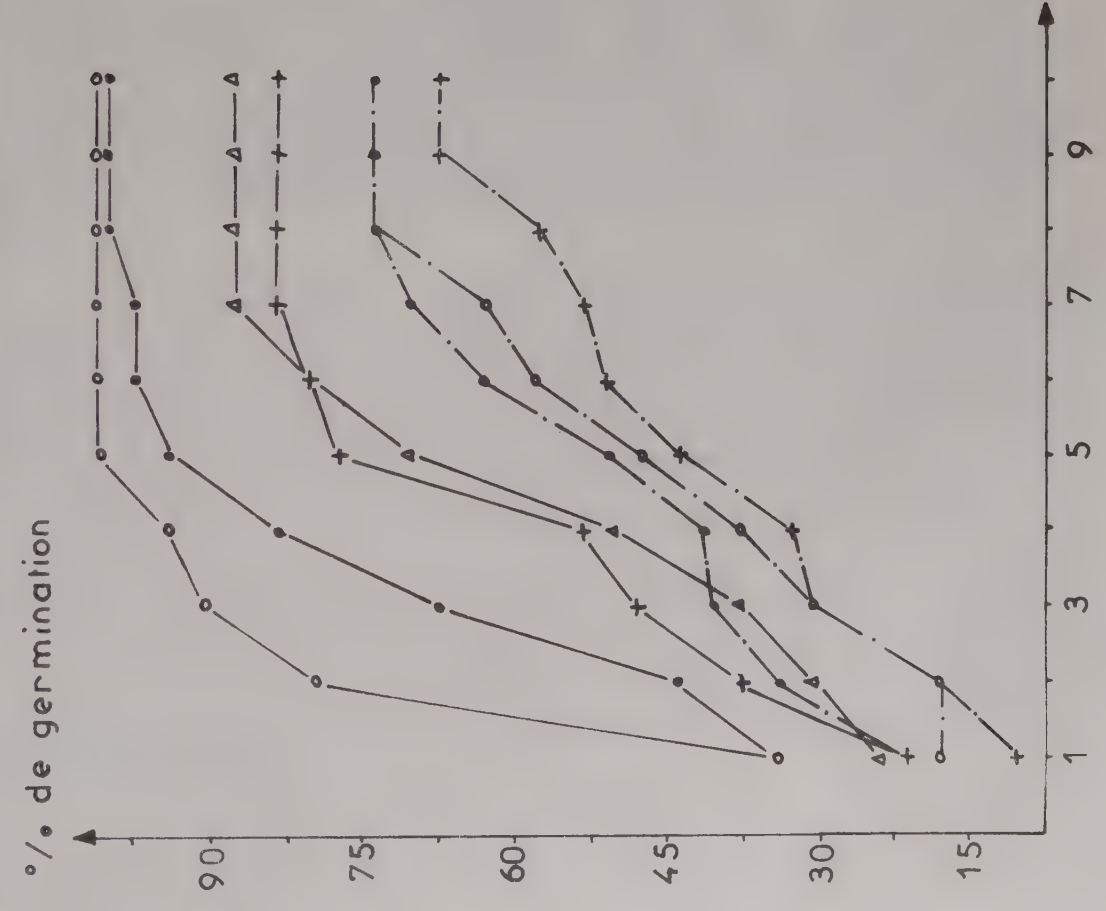
Graines germées traitées par H_2O_2

Graines contaminées traitées par H_2O_2

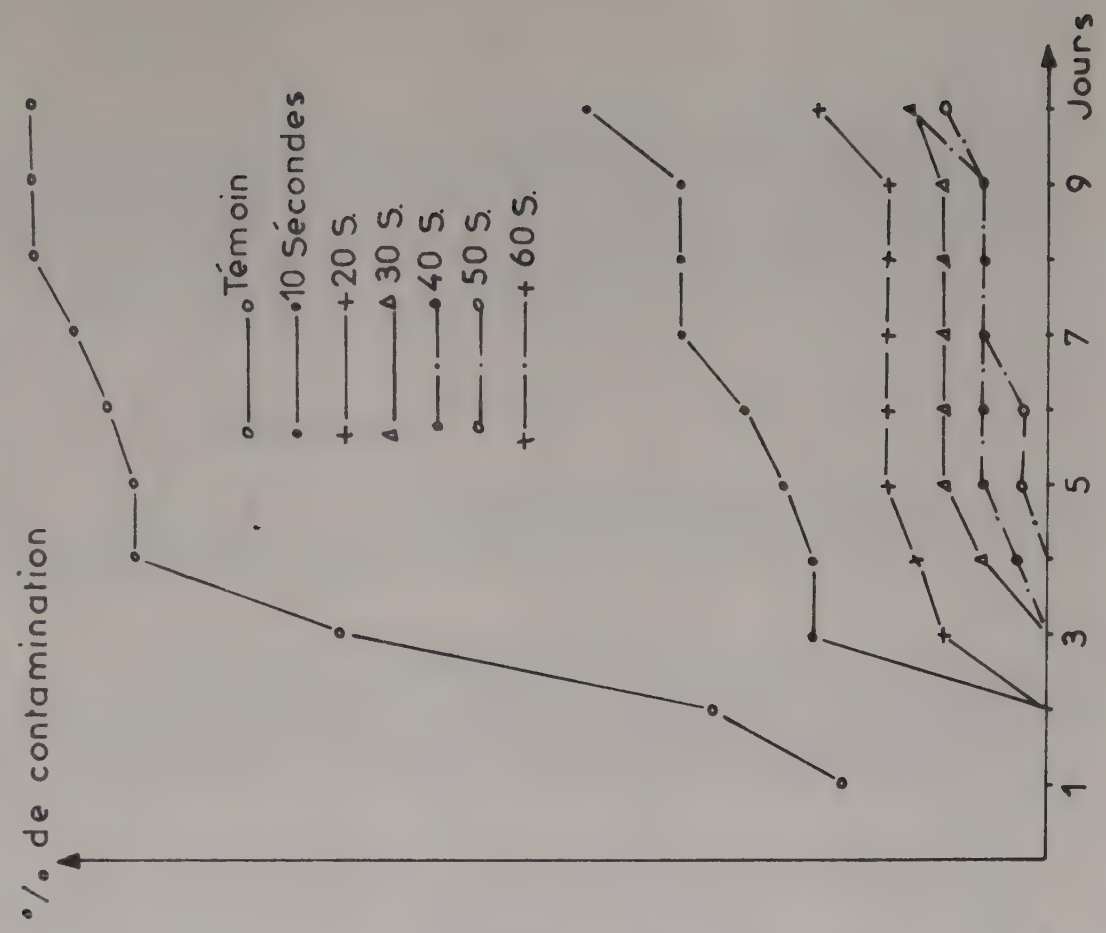


(Fig. 3)

Graines germées traitées par $HgCl_2$



Graines contaminées traitées par $HgCl_2$



Le tableau V présente les résultats obtenus avec Fg Cl_2 et avec H_2O_2 . Il ressort de ce tableau que le chlorure mercurique pour les temps de traitement de 20 et 30 secondes et surtout à partir de 40 secondes diminue fortement les taux de germination par rapport aux témoins, alors que l'eau oxygénée n'a pas d'effet marqué.

Conclusion :

Le prétraitement par immersion au froid est favorable à une germination rapide des graines. On peut penser qu'il agit :

- en imbibant les semences qui ont besoin d'eau pour germer (RONNET, MAZIMBERT comm. pers.). Une journée d'immersion à température ordinaire suffirait d'ailleurs pour obtenir ce résultat. Ceci expliquerait le retard de germination des graines non traitées par rapport aux graines traitées.

- en enlevant les substances inhibitrices qui peuvent être présentes dans les téguments. A cet égard, le changement d'eau est probablement important, car une eau de trempage non renouvelée présente après deux semaines, une teinte brun-noir. En outre, les expériences réalisées à la station d'amélioration du C.N.R.F. montrent que l'oxygénation du milieu est un facteur important, car des graines immergées en anaérobiose sont ensuite incapables de germer, alors que celles mises à tremper dans une eau bien aérée germent normalement.

En ce qui concerne la méthode de stérilisation nous avons besoin d'une technique qui fournisse un taux de contamination nul ou très faible. En effet, toute boîte présentant une seule contamination est éliminée; si chaque boîte contient 20 graines et que le taux de contamination est de 5%, la probabilité pour que chaque boîte soit infectée est forte, donc, comme on l'a vu, seuls les traitements d'une minute par Fg Cl_2 et une heure par H_2O_2 sont utilisables, mais le chlorure mercurique est toxique pour cette durée d'action : il réduit le taux de germination et la longueur des radicules, donc probablement la vigueur des plantules. Au contraire, H_2O_2 n'a pas d'action résiduelle défavorable sur la germination des plantules car, étant très volatil, il ne laisse pas de traces inhibitrices.

Contrairement à TRAPPE (1961), nous n'avons pas constaté d'augmentation du taux de germination, après traitement par l'eau oxygénée, mais ceci peut s'expliquer par :

- la faculté germinative naturellement élevée des semences de Montriond ;
- le prétraitement par immersion au froid.

II - ESSAIS DE SYNTHÈSES EN CONDITIONS CONTRÔLÉES -

Introduction :

La synthèse est une opération qui consiste à cultiver ensemble un Champignon à tester et une plante dépourvue d'autre symbionte. La méthode la plus sûre et la plus généralement pratiquée est celle de la synthèse axénique ; celle-ci est normalement réalisée selon la méthode de HACSKAYLO (1953). Une autre technique a été récemment introduite par PACFLEWSKI (1968), celle de la culture sur gélose.

Si ces synthèses axéniques sont nécessaires pour prouver le caractère symbiotique d'un Champignon, on peut leur reprocher les conditions artificielles dans lesquelles elles sont réalisées (TRAPPE, 1962). Diverses manières de cultiver les plantules en conditions plus naturelles ont été proposées. TRAPPE (1962) fait croître la partie aérienne des plantules en conditions axéniques. LAIPO (1970), GRENFÉ et CHEVALIER (comm. pers.) ont proposé l'emploi de cultures semi-axéniques : un substrat naturel, généralement du sol, est stérilisé puis réinoculé de façon à être exempt de tout organisme pathogène ou de symbionte différent de celui qu'on veut tester. Ce dernier, étant introduit massivement dans le sol stérile, est immédiatement en contact avec les racines de l'hôte et les contaminations aériennes n'empêchent pas la mycorrhization.

A - MATÉRIEL ET MÉTHODES -

Les milieux de culture à utiliser doivent permettre une bonne croissance à la fois de la plante et du Champignon.

Au cours des premiers essais de synthèse mycorrhizienne, on a utilisé comme substrat solide du sable

(MELIN, 1924) mais celui-ci a une mauvaise structure :

- à la base, le milieu est saturé, les racines sont en conditions asphyxiques ;

- en surface, le substrat se dessèche et la croissance du Champignon est pauvre.

Depuis le travail de KACSKAYLO (1953), la vermiculite est devenue d'usage courant pour les cultures des plantes et des symbiontes fongiques. Ce substrat possède une capacité de rétention élevée et une forte porosité, ce qui permet de bons échanges gazeux au niveau des racines et du mycélium. MARX et ZAY (1965) puis SUGGS et GRAND (1972) ont amélioré la technique notamment en ajoutant de la tourbe à la vermiculite.

Ce support est imbibé de solutions nutritives variables suivant les auteurs. Un choix judicieux de ces dernières permet de modifier la réaction du milieu.

Dans ce but, nous employons le milieu de MARX en utilisant l'un ou l'autre des deux phosphates d'ammonium et de potassium.

Ca Cl ₂	0,05 g.
Na Cl	0,025 g.
KH ₂ PO ₄	0,5 g.
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25 g.
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0,15 g.
Fe Cl ₃ (1%)	1,2 ml.
Thiamine H Cl	100 µg.
Extrait de malt	3 g.
Saccharose	10 g.
H ₂ O	1 l.

pH = 6,5

Milieu de MARX en remplaçant KH₂PO₄ par K₂HPO₄ - pH = 7,8.

Milieu de MARX en remplaçant (NH₄)₂HPO₄ par NH₄H₂PO₄. - pH = 5.

Les différentes préparations sont stérilisées 20 minutes à l'autoclave à 120°C deux fois de suite, à 24 heures d'intervalle. Le pH est ensuite mesuré. Nous avons retenu pour nos essais le mélange suivant :

- 100 ml de milieu de MARX ($\text{NH}_4\text{F}_2\text{PO}_4$)
- 30 ml de tourbe
- 120 ml de vermiculite

Le pH final de ce mélange est de 5,6.

Nous avons également utilisé le milieu conseillé par PASCHLEWSKA (1968) :

- gélose 15 g.
- thiamine 100 g.
- H_2O 1 litre

Techniques de culture :

Nous avons cherché à déterminer parmi les différentes méthodes que nous venons d'énumérer, celle qui donnait les meilleurs résultats :

1) Cultures axéniques en fioles :

Les réipients utilisés doivent permettre une manipulation facile, notamment en ce qui concerne le repiquage des plantules et l'inoculation des Champignons à tester, en conservant les conditions axéniques de la culture. Ils doivent être de taille suffisante pour la croissance ultérieure des plantules et laisser passer la lumière et les gaz, tout en maintenant une humidité suffisante du milieu.

Nous avons pour cela généralement adopté des fioles coniques de 250 ml, à col large. Pour la stérilisation, les fioles sont bouchées avec un tampon de coton recouvert d'une feuille de papier aluminium. Le coton est laissé en place jusqu'au repiquage des plantules. Il est alors enlevé et la fiole recouverte d'une feuille de polyéthylène ou de Parafilm, stérilisée sous rayonnement ultraviolet. Ces matériaux sont réputés permettre les échanges gazeux tout en étant imperméables à la vapeur d'eau. Cette méthode permet donc des cultures prolongées

Ces cultures sont réalisées dans le mélange de vermiculite et de tourbe humecté de solution nutritive de MARX.

Inoculation :

Le Champignon à étudier est cultivé en fioles contenant une solution à 1,5% d'extrait de malt ; ces fioles sont placées sur un agitateur rotatif et incubées pendant un mois à la température du laboratoire (+ 20° à + 23°C). A ce moment, chaque fiole contient un certain nombre de colonies sphériques, de taille variable. Une ou plusieurs de ces colonies sont alors prélevées et transférées dans les fioles contenant le mélange de vermiculite et de tourbe. Deux semaines d'incubation supplémentaires permettent au Champignon de se développer abondamment dans le substrat. Trois plantules axéniques âgées d'une semaine sont repiquées dans chacune des fioles. Après bouchage au Parafilm (planche 1), celles-ci sont placées en salle climatisée et éclairée (16 heures d'éclairage à 10 000 lux, 24°C; 8 heures d'obscurité, 18°C) pendant 4 mois. A la fin de l'expérience, les plantules sont retirées, leur système racinaire est lavé et examiné sous la loupe binoculaire. Les racines courtes, renflées, dépourvues de poils absorbants sont prélevées et des coupes sont préparées à l'aide d'un microtome à congélation. Il est préférable de fixer les racines courtes dans le mélange formol - acide acétique - alcool éthylique (5 - 5 - 90 ml) ou le formol à 20%. Les coupes sont montées dans le bleu d'aniline au lactophénol entre lame et lamelle et observées au microscope. La présence d'un réseau de FARTIG et, éventuellement, d'un manteau, permet de confirmer la production d'une association mycorrhizienne.

2) Cultures axéniques en tubes sur gélose :

Nous avons utilisé des tubes à essais de 40 x 300mm, bouchés avec du coton, contenant 100ml de milieu de PASCHLEWSKA. L'inoculation du Champignon à tester est effectuée par un fragment d'une préculture sur extrait de malt à 1,5% gélosé. Après deux semaines de développement du Champignon, une plantule axénique est placée à la surface et la radicelle est légèrement enfoncée dans la gélose. Les tubes, dont la partie inférieure est entourée d'un papier noir, sont placés en salle climatisée et éclairée comme précédemment.

3) Cultures semi-axéniques : trois méthodes ont été utilisées :

a) 600g. du sol de la station de la SIVRITE tamisé à 5mm sont placés en pot de terre cuite ($\emptyset$ = 13cm, h = 12cm) et amenés à la capacité de rétention.

Ces pots sont emballés dans du papier et stérilisés à l'autoclave en vapeur fluente pendant 1 heure à deux reprises, à 24 heures d'intervalle. Nous avons versé dans chaque pot 100ml d'une préculture liquide sur extrait de malt, bien développée (deux semaines à un mois selon les espèces). Le sol de chaque pot est mélangé avec le mycélium, ensuite des plantules axéniques âgées d'une semaine sont repiquées immédiatement. L'incubation a été effectuée sous éclairage de 4 500 lux pendant 16 heures par jour, à la température du laboratoire (+ 20 à + 23°C). L'humidité est maintenue par arrosage bi-hebdomadaire à l'eau ordinaire ; 4 mois après, les plantules sont retirées, lavées et examinées.

b) Les pots sont préparés comme ci-dessus. Les Champignons à tester sont cultivés dans des fioles coniques de 250ml, contenant le mélange vermiculite-tourbe utilisé dans le paragraphe A, pendant deux semaines puis l'inoculation est effectuée en versant le contenu d'une fiole de culture dans un pot, mélangé avec le sol de ce dernier. Les plantules sont ensuite repiquées.

Les pots sont traités comme précédemment.

c) La préculture du mycélium a été effectuée en boîtes de Pétri contenant du sol de la SIVRITE stérilisé, sur une hauteur de 1cm environ. Après 4 semaines d'incubation à 23°C, le contenu de chaque boîte est mélangé au sol stérilisé d'un pot.

B - CHAMPIGNONS ETUDIÉS -

a) *Paxillus involutus* (Batach ex Fr) Fr.
La culture de ce Champignon a été isolée à partir d'un carpophore provenant de la forêt de Sainte-Hélène (récolte Pr. L. Lanier).

b) *Cenococcum graniforme* (Sow.) Fred et Winge. Isolé de sclérotés provenant de la station de la Sivrite.

c) *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex St. Am.) Québ. Isolé de carponphores provenant de la même station.

d) *Tricholoma albobrunneum* (Pers. ex. Fr.) Kumm. Isolé de carponphores récoltés dans une plantation de Pin noir d'Autriche à proximité de la station de Gondreville.

C - RESULTATS ET DISCUSSION -

1) Synthèses axéniques en fioles :

Les 4 espèces étudiées ont formé des mycorrhizes avec l'Epicéa. Nous rapportons ici en détail les résultats concernant *Paxillus involutus*. Le tableau VI permet de comparer les plantules mycorrhizées et les témoins.

Chez les plantules inoculées, à peu près la moitié des racines courtes sont transformées en mycorrhizes. La croissance en poids est supérieure à celle des témoins, le nombre d'aiguilles est également plus élevé ce qui indique que la plante bénéficie le plus de la mycorrhization.

Description des mycorrhizes : (Planche 2)

- aspect macroscopique :

Mycorrhizes brun-orangé clair, allongées, sensiblement cylindriques, non ramifiées, entourées de rhizomorphes et de sclérotés.

- aspect microscopique :

. manteau : il semble formé de deux couches : vers l'extérieur, une zone à structure lâche, prosenchymateuse; vers l'intérieur, une zone à structure plus dense, probablement pseudo-parenchymateuse.

. couche tanifère : une seule assise de cellules à contenu brun-clair.

. réseau de Hartig : il commence à se

TABEAU VI

Champignon	Feuilles	Poids de racines (mg)	Poids de partie aérienne (mg)	Nbre de mycorrhizes	Nbre de racines non mycorrhizées	$\frac{S}{R}$
<i>P. involutus</i>	25+ 2,7	25+6	27+2,6	45 + 15	32 + 9,7	1,1
<i>C. graniforme</i>	24+ 5,5	27+16	26+5,5	172 + 37	84 + 47	1
<i>H. crustuliniforme</i>	37+3	30+9,1	43+17	89 + 33	110 + 39	1,4
<i>T. albobrunneum</i>	26+2,7	34+6,2	31+2,2	69 + 35	38 + 15	0,9
Témoin	19+3	18,5+3	25+4	-	68 + 6	1,3

Moyenne de 6 plantes

$$\frac{S}{R} = \frac{\text{Shoot}}{\text{Root}} = \frac{\text{P. aérienne}}{\text{racines}}$$

former sous la cuticule, entre celle-ci et la couche tanifère ; il pénètre ensuite dans l'écorce, jusqu'à l'endoderme. Il est unistrate, brun-clair, large de (3,5) - 6 - (7,1) μ .

Ces mycorrhizes appartiennent au sous-type C dans la classification de Dominik.

2) Essais de synthèse en milieu pauvre :

Cette synthèse a été réalisée dans le mélange de vermiculite et de tourbe, simplement humecté par de l'eau distillée. Deux Champignons mycorrhiziens sont choisis pour l'inoculation, un frugal : *C. graniforme* et l'autre exigeant : *L. deliciosus*. Après 4 mois de culture dans la salle climatisée éclairée, les plantules sont retirées et examinées à la loupe binoculaire. Seul *C. graniforme* a pu former des mycorrhizes ; il semble qu'il n'était pas gêné par la pauvreté du milieu, contrairement à *L. deliciosus* qui n'a pas pu croître ni provoquer de mycorrhization. Ceci constitue une autre preuve que *C. graniforme* est un symbionte frugal, peu exigeant et qui pousse dans des conditions écologiques très difficiles.

Description :

Les mycorrhizes obtenues sont de couleur brun-clair ou brun-foncé. Les coupes au microscope montrent qu'elles sont dépourvues de manteau, entourées simplement par des hyphes du Champignon. Les cellules de l'écorce sont entourées par le réseau de Hartig qui mesure (1) - 2 - (3) μ de largeur. Les cellules corticales sont remplies de tanin de couleur brun-rouge. L'absence du manteau ne permet pas de placer des mycorrhizes dans le système de Dominik.

3) Synthèse en tubes de gélose :

Deux souches ont été utilisées : *C. graniforme* et *P. involutus*. Après 4 mois de croissance, les racines qui se sont développées en dehors de la gélose, principalement entre la paroi du tube et le milieu solide sont entourées d'un abondant feutrage mycélien. Au contraire, les racines développées dans la gélose paraissent indemnes de Champignon.

L'examen microscopique montre qu'il n'y a pas eu de formation de véritables mycorrhizes. Le mycélium entoure la racine d'un manchon plus ou moins épais et, dans le cas de

P. involutus, pénètre dans les premières cellules de l'écorce (planche 3, photo 1). On pourrait donc assimiler ces formations aberrantes à des mycorrhizes péritrophes, ou encore, en ce qui concerne *P. involutus*, à des pseudomycorrhizes. Les racines formées dans la gélose sont entièrement dépourvues de Champignon. Cette méthode ne nous a donc pas donné de résultat positif bien que les deux Champignons utilisés forment aisément des mycorrhizes dans d'autres conditions de culture. De même LUNDEBERG (1960) dans des essais de synthèse entre *Pinus sylvestris* et divers Bolets, n'a obtenu en milieu liquide que des mycorrhizes péritrophes et des pseudomycorrhizes avec pénétration intra-cellulaire.

4) Culture semi-axénique :

- *C. graniforme* : En utilisant une culture sur vermiculite et tourbe comme inoculum, nous avons obtenu après un mois de croissance, des mycorrhizes avec un réseau de Hartig typique, et, plus rarement, un manteau.

A la loupe binoculaire, les racines courtes apparaissent généralement fines et allongées, brun-foncé avec l'extrémité brun-clair, non ramifiées.

Au microscope : en coupe, les mycorrhizes obtenues sont généralement dépourvues de manteau (planche 3, photo 2) mais elles sont entourées par les hyphes du Champignon. Les cellules de l'écorce sont entièrement entourées par le réseau de Hartig, la lame fongique mesurant (3,5) - 5,3 - (7,1)mm. Toutes les cellules corticales sont remplies de tanin brun-rouge plus ou moins foncé, mais l'endoderme est incolore.

- *H. crustuliniforme* : Le Champignon a été inoculé sous forme de mycélium obtenu en culture liquide. Après deux mois et demi de culture, on a pu observer la présence de racines courtes mycorrhizées, avec un réseau de Hartig mais dépourvues de manteau (planche 3, photo 3).

Description des mycorrhizes :

- Aspect macroscopique :

Les mycorrhizes formées sont généralement assez longues, cylindriques (dimensions : (0,8) - 1,8 - (3,5) mm, peu ramifiées, de couleur ocre, entourées d'un

mycélium blanc.

- Aspect microscopique :

Les mycorrhizes sont dépourvues de manteau, mais elles sont entourées par des hyphes hyalines. Réseau de Hartig unistrate, épais de 3,5 à 4 μ , possédant de très nombreuses cloisons pénétrant jusqu'à l'endoderme.

En raison de l'absence de manteau, ces mycorrhizes ne peuvent être placées dans le système de Dominik.

- T. albobrunneum et C. graniforme : Ces deux Champignons ont étéensemencés à partir de préculture sur sol. Quatre séries de trois pots sont préparées :

- témoins non inoculés
- T. albobrunneum
- C. graniforme
- C. graniforme + T. albobrunneum.

Après repiquage de plantules, la culture est poursuivie pendant 4 mois. A la fin de l'expérience, les plantules sont retirées et leur système racinaire examiné. Les éléments suivants sont notés : poids de partie aérienne, poids de racines, nombre de racines non mycorrhizées, nombre de mycorrhizes noires, nombre de mycorrhizes claires. Les résultats sont rassemblés dans le tableau VII et les chiffres représentent la moyenne de 10 plantules.

. mycorrhizes à C. graniforme :

Elles sont semblables à celles décrites plus haut et ici aussi, elles sont dépourvues de manteau.

. mycorrhizes claires : (planche 3, photo 4),

T. albobrunneum seul n'a pas formé de mycorrhizes. En présence de C. graniforme, on rencontre à côté des mycorrhizes noires, un petit nombre de mycorrhizes claires également dépourvues de manteau mais le réseau de Hartig est très épais. Nous ne savons pas quel est le Champignon responsable de leur formation. PARK (1970) a montré que les jeunes mycorrhizes formées par C. graniforme chez *Tilia americana* sont de teinte claire et ne deviennent noires qu'à l'état senescent. Du point de vue de la croissance, c'est le mélange des deux Champignons qui a donné les meilleurs résultats,

TABLEAU VII

Champignon	Poids de racines mg	Poids de partie aérienne mg	Nbre de racines non mycorrhizées	Nbre de mycorrhizes noires (c.g.)	Nbre de mycorrhizes claires
Témoin	40,2 $\pm$ 21	42,4 $\pm$ 13,3	145 $\pm$ 45	-	-
<i>T. albobrunneum</i>	36,3 $\pm$ 5,3	41,1 $\pm$ 7,8	92 $\pm$ 20	-	-
<i>C. graniforme</i>	24,8 $\pm$ 10,5	34,8 $\pm$ 11	58,2 $\pm$ 19	35,6 $\pm$ 30	-
<i>T. alb.</i> + <i>C. gr.</i>	51,7 $\pm$ 6,7	49,5 $\pm$ 7,8	43,4 $\pm$ 21	136,1 $\pm$ 38	12,5 $\pm$ 10,1

tandis que les plantules poussant en présence de *C. grani-*
forme ont moins poussé que les témoins.

Conclusion :

Nous sommes maintenant en mesure
d'obtenir de façon assez sûre et reproductible des synthèses :

Les synthèses axéniques en tubes gélosés n'ont pas donné des résultats positifs pour *Picea*. Elles sont très longues (au moins un an d'après PASCHLEWSKI (1973), très artificielles et sans intérêt pour nous.

Les synthèses axéniques en fioles, constituent essentiellement un moyen de vérifier le caractère symbiotique d'une souche de Champignon donné. Elles donnent des résultats positifs dans la plupart des cas mais elles ne renseignent pas sur l'efficacité symbiotique du Champignon.

Les synthèses semi-axéniques au contraire mettent les plantules dans des conditions plus naturelles et permettent donc des comparaisons plus valables entre plantules témoins et plantules mycorrhizées par divers symbiontes. Cette technique donne moins de résultats positifs que les synthèses axéniques en fioles mais elle pourrait rendre de grands services aux sylviculteurs pour étudier l'effet de différents symbiontes sur la croissance des arbres, à condition de pouvoir identifier le Champignon qui provoque les mycorrhizes. Elle pourrait être utilisée ensuite pour préparer des plantules mycorrhizées par les Champignons qui se seraient révélés les plus efficaces. Rappelons que l'application de ces méthodes est très sérieusement envisagée par les spécialistes, surtout pour la reforestation d'aires déboisées (MIKOLA 1969-1970, FORTIN et PINEAU 1971). MOSER (1958 a, b) a pratiqué l'inoculation artificielle pour le reboisement dans les montagnes autrichiennes. La production, chez le Chêne et le Noisetier, de plants mycorrhizés par la truffe destinés à réimplanter ce Champignon en terrain favorable est actuellement au stade de l'application pratique (GRENTE et CHEVALIER 1973).

BJORKMAN (1970) rapporte que de très jeunes plants de Pin meurent en cas d'inoculation artificielle. Il faut qu'ils aient 1 ou 2 mois pour supporter la présence du Champignon et en tirer profit. Quelques essais préliminaires nous ont montré qu'il n'en était pas de même chez l'*Epicéa*. On peut même faire germer des graines sur le substrat inoculé mais, pour être sûr que les plantules sont axéniques, nous avons préféré adopter la méthode de germination sur eau gé-

losée décrite plus haut. Par la suite, nous avons toujours repiqué les plantules après une semaine de germination ; à ce stade, la radicelle est encore très courte (1 à 2cm), les manipulations sont faciles et la racine se développe directement dans le substrat. Notre méthode est donc différente de celle pratiquée par la plupart des autres auteurs qui inoculent le substrat par le Champignon après 1 ou 2 mois de croissance des plantules.

Nous avons constaté que pour obtenir un nombre élevé de mycorrhizes, il est très important que les racines se développent dans un milieu bien envahi par le Champignon. Nous pensons que si une racine courte se forme au contact du partenaire fongique, elle donne naissance directement à une mycorrhize. C'est le défaut de croissance du Champignon qui expliquerait l'échec de certaines synthèses (KIFFER 1974).

CHAPITRE II

ETUDE DES MYCORRHIZES IN SITU

I - DESCRIPTION DES STATIONS -

Dans le programme d'étude des mycorrhizes auquel nous participons, l'observation des mycorrhizes formées in situ constitue un préliminaire indispensable à la connaissance des relations symbiotiques de l'Epicéa. Pour des raisons pratiques de facilité d'accès et aussi en raison de l'intérêt éventuel des plantations d'Epicéa sur les plateaux calcaires (DECOURT et LETACON 1970), nous avons choisi pour la plupart de nos études sur le terrain deux pessières du plateau de Haye à l'ouest de NANCY. L'une de ces stations est située sur sol forestier tandis que l'autre est un reboisement sur un ancien sol agricole.

A - Station de la SIVRITE :

Altitude 370m ; située dans l'arboretum du même nom, cette parcelle a été replantée en Epicéa en 1942. Le sol est considéré par GURY (1972) comme un sol brun faiblement lessivé. Le matériau parental est une couche épaisse de *Terra fusca*. Les caractéristiques physico-chimiques de l'horizon A₁ (0-10cm) ont été déterminées comme suit par le Centre de Pédologie biologique :

pH	4,5	
matière organique	6,6%	
Ca CO ₃	0	
C Organique	3,3%	
N total	0,16%	$\frac{C}{N} = 15,6$

La végétation potentielle de cette partie de la forêt de Haye correspond selon BECKER (1972) à la hêtraie chênaie- neutro-mésophile.

La densité des arbres est de 2 700 à 1'hectare et leur diamètre moyen de 17cm à 1m 30. Les arbres ne sont pas fertiles, sauf quelques porte-graines probablement plus anciens que le reste de la plantation. Les arbres sont plantés à une distance de 1 x 2,5m. Une coupe d'éclaircie intéressant une ligne sur trois a été pratiquée en 1959.

Sous ce peuplement assez dense, la luminosité est faible : elle a été déterminée à l'aide d'un luxmètre en différents points de la station au niveau du sol. Là où les arbres sont serrés, la luminosité varie entre 1/40 et 1/10 de la valeur obtenue dans une clairière prise comme référence. Dans les zones les plus sombres, le sol ne porte aucune végétation mais seulement la litière d'Epicéa. Dans les écarts entre les lignes d'arbres, la luminosité devient un peu plus forte : 1/7 à 1/5 de la valeur de référence ; ces zones protent un peu de Lierre (*Hedera helix* L.). Enfin, quelques zones plus éclairées (1/3 de la valeur de référence) portent des Bryophytes, essentiellement *Plagiochila asplenioïdes*, ainsi qu'une autre Hépatique: *Lophocolea bidentata* Dum, et une Mousse : *Eurhynchium striatum* (Schreb.) Schimp. Nous n'avons jamais constaté de régénérations dans cette station.

B - Station de Gondreville : altitude de 260m.

Entre les localités de Gondreville et Villers-le-Sec, la qualité médiocre des sols a souvent conduit l'agriculteur à reboiser les endroits trop difficiles à cultiver, généralement en Pin noir d'Autriche, plus rarement en Epicéa. Le sol est une ancienne rendzine brune anthropique formée à partir d'une *terra fusca* superficielle sur calcaire. La couche de sol est épaisse de 10-15cm et contient de très nombreux cailloux calcaires.

Caractères physico-chimiques :

pH	7,4	
matière organique	7,2%	
Ca CO ₃	35,0%	
C organique	3,60%	
N total	0,20%	$\frac{C}{N} = 18,0$

La végétation potentielle de cette zone correspond probablement à une hêtraie.

Les arbres sont très denses (6 000 à 1'hectare). Leur diamètre moyen est de 6cm à 1m 30. Cette plantation destinée à récupérer une friche n'a pas reçu de soins sylvicoles; les éclaircies correspondent en partie au prélèvement de quelques arbres par le propriétaire, mais probablement surtout à l'insuccès de la reprise lors de la plantation effectuée vers 1939. Les arbres n'ont jamais été élagués et l'absence d'élagage naturel rend l'accès de cette station difficile. Les arbres sont fertiles et les cônes abondants.

Dans les zones très denses, la luminosité va de moins de 1/100 à 1/20 de l'éclairement général à découvert. Ces zones ne portent aucune végétation, mais seulement de la litière. Dans les éclaircies de taille très variable, la luminosité est comprise entre 1/15 et 1/3 de la valeur de référence. Les zones sont couvertes de Bryophytes ; ce sont trois Mousses : *Pseudoscleropodium purum* Hedw. Fleisch. étant la plus abondante ; *Ctenidium molluscum* Schimp Mitt. et *Thiridium tamariscifolium* (Hedw) Lindb, et une Hépatique : *Lophocolea bidentata*. On trouve aussi quelques représentants du lichen : *Cladonia furcata* Ach. Dans ces zones à Bryophytes, on rencontre des régénérations abondantes sous forme de petits semis d'*Epicea*.

Le peuplement n'est pas entièrement pur mais contient notamment quelques Pins noirs d'Autriche. Nous avons pu observer quelques petits semis et jeunes arbres de cette essence, ainsi que de rares régénérations de Chêne et de Hêtre d'origine inconnue, liées toujours aux éclaircies.

En résumé, notre étude portera donc sur deux stations d'*Epicea* de caractéristiques bien différentes :

- à la Sivrite, un sol forestier profond, acide, dépourvu de calcium, portant une plantation soignée et productive ;
- à Gondreville, un ancien sol agricole, squelettique, très calcaire, avec un peuplement médiocre sans aucune valeur économique.

Puisque ces deux stations sont d'altitude peu différente et situées seulement à 12km à vol d'oiseau l'une de l'autre, on peut penser que les conditions climatiques ne sont pas le facteur dominant dans l'évolution des peuplements que nous étudions, et qu'en particulier les

différences rencontrées au niveau de leurs systèmes racinaires sont dues essentiellement au sol quoique peut-être l'origine et la conduite des peuplements aient leur importance.

Rappelons ici les caractéristiques du climat lorrain que VENET définit comme : "Un climat de transition entre le climat parisien à influences encore atlantiques et le climat d'Europe centrale à influences continentales... caractérisé par des extrêmes marqués de températures en hiver et en été, avec passage brutal d'une saison à l'autre." Le même auteur fournit les données climatiques suivantes pour Nancy à l'altitude de 220m :

Températures :	moyenne annuelle	:	9,3°C
	extrême janvier	:	0,3°C
	extrême juillet	:	18,8°C
	nombre de jours de :		80 jours gelées

Pluviosité annuelle	:	726mm
minimum en mars	:	39mm
maximum en juin	:	78mm

Pour la forêt de Faye, ces valeurs diffèrent légèrement de celles de Nancy.

II - COMPTAGE ET DESCRIPTION DES MYCORRHIZES -

Afin d'essayer de relier les caractères des stations à ceux des mycorrhizes qui s'y sont formées, nous avons étudié ces dernières de façon qualitative et quantitative.

Après avoir procédé à une estimation du nombre et du poids des mycorrhizes dans nos deux sols, nous avons cherché à connaître le pourcentage des différents types mycorrhiziens selon la saison et selon la couverture végétale.

A - Techniques :

1) Comptage_général : Mai 1972 :

Nous avons effectué 10 sondages dans chaque station à l'aide de cylindres d'acier de 26mm de diamètre. Dans chaque station, nous avons délimité une zone de prélèvements de 20m de côté, divisée en 100 quadrats de 2m sur 2m. Au centre de 10 de ces quadrats, déterminés à l'aide d'une table de nombres choisis au hasard, on prélève une carotte de 5cm de profondeur. Ces prélèvements sont placés dans des sachets de matière plastique, transportés et utilisés le plus tôt possible au laboratoire.

Chaque échantillon est traité séparément par t empage dans l'eau d'un cristalliseur suivi d'un lavage prolongé sur deux tamis superposés, d'ouverture de 1mm pour le tamis supérieur et 0,2mm pour le tamis inférieur.

Ce lavage est destiné à enlever le plus possible de terre qui enveloppe les racines.

Le résidu est placé en boîte de Pétri, observé sous la loupe binoculaire et débarrassé de toutes les fractions non racinaires. Les mycorrhizes sont comptées puis l'ensemble de l'échantillon est séché à l'étuve à 105°C et pesé. On détermine ainsi un rapport :

$$\frac{\text{nombre de mycorrhizes}}{\text{poids de racines}}$$

(KILBERTUS et MANGENOT, 1972). De plus, on a noté le nombre de 4 catégories de mycorrhizes:

- claires
- brun clair
- brun foncé
- mycorrhizes noires à *Cenococcum*

graniforme.

Les trois premiers types sont différenciés selon leur couleur, on considère comme mycorrhizes vivantes toutes celles qui sont plus ou moins cylindriques et turgescentes; les mycorrhizes mortes sont généralement brun foncé, de forme irrégulière et d'aspect ridé. Leur extrémité n'est jamais claire.

Les mycorrhizes formées par *C. graniforme* se reconnaissent à leur manteau noir et parfois aux hyphes dressées qui partent du manteau.

2) Observations saisonnières :

En fonction des résultats obtenus par la méthode précédente, nous avons cherché à connaître le pourcentage de différents types de mycorrhizes et la proportion de racines courtes mortes et vivantes. Ces déterminations ont été effectuées à intervalles de trois mois pendant une année.

Le comptage est effectué sur 100 racines courtes à partir de quelques portions du système racinaire choisies au hasard dans chaque quadrat (cf. paragraphe précédent).

3) Observation des mycorrhizes à différentes profondeurs et sous différentes litières :

Les prélèvements sont effectués en trois points dans chaque station : à l'aide de la sonde de 26mm de diamètre, trois profondeurs sont prélevées : de 0 à -5cm, de -5cm à -10cm et de -10 à -15cm.

Pour l'étude de l'influence des litières de Bryophytes, les prélèvements n'ont pas été effectués au hasard mais en des points choisis de zones recouvertes par ces végétaux. Les racines sont lavées à l'aide de deux tamis, comme dans le cas du comptage général, mais ici, nous avons adopté une procédure de comptage inspirée de celle de MARKS et al. (1968) : les mycorrhizes de la partie du système racinaire restée sur le tamis supérieur sont comptées entièrement ; celles retenues par le tamis inférieur sont récupérées et mises en suspension dans environ 10 ml d'eau puis réparties dans une boîte à fond carré portant un quadrillage à intervalle de 1,3cm.

Les mycorrhizes se répartissent ainsi sur 36 carreaux ; on compte le contenu de 6 d'entre eux. Cette technique facilite beaucoup les numérations en réduisant les opérations portant sur les mycorrhizes séparées des racines mères qui se retrouvent ici dans le tamis inférieur à mailles fines.

B - Résultats :

1) Comptage général :

Le tableau VIII résume les résultats obtenus respectivement pour la station de la Sivrite et de Gondreville.

TABLEAU VIII

Sol	mycorrhizes			Poids total (mg)	Nbre de mycorrhizes par mg de racines sèches	Nbre de mycorrhizes par ml de sol
	brunes	claires	<i>C. graniforme</i>			
SIV	1350+441	209,6+99	158 ± 70	374,8	6,19	65 ± 11
GDV	2743±1650	108±68	661 ± 206	345,1	10,76	132 ± 11

SIV = station de la Sivrite

GDV = station de Gondreville

Il n'y a pas de différences significatives entre stations pour le poids de racines obtenues par sondage, ni pour le pourcentage des mycorrhizes brunes.

En revanche, les différences sont significatives pour le pourcentage des mycorrhizes claires et hautement significatives pour le nombre de mycorrhizes par mg de racines, le nombre de mycorrhizes par ml de sol et le pourcentage de mycorrhizes noires à *C. graniforme*

2) Observations saisonnières :

Le tableau IX et la figure 5 présentent le pourcentage des différents types mycorrhiziens reconnus pour les deux stations et les quatre époques de prélèvement :

automne	(novembre 1972)
hiver	(février 1973)
printemps	(mai 1973)
été	(août 1973)

A la Sivrite, on remarque immédiatement la forte proportion de mycorrhizes brun clair au printemps ; au contraire, les mycorrhizes brun foncé et mortes sont plus abondantes en automne et en hiver. Il est évident que les premières sont les racines courtes nouvellement formées au printemps et qu'elles deviennent plus foncées ou meurent ensuite. Le pourcentage de mycorrhizes noires à *C. graniforme* est remarquablement constant.

A Gondreville également, les mycorrhizes claires sont plus abondantes au printemps, les mycorrhizes foncées et mortes plus nombreuses en hiver.

3) Observations des mycorrhizes à différentes profondeurs et sous différentes litières :

Les résultats sont donnés dans la figure 6 et les tableaux X et XI : le nombre total de mycorrhizes est plus élevé en surface et décroît avec la profondeur, les mycorrhizes sont plus ou moins nombreuses sous Bryophytes que sous litière. En ce qui concerne

TABLEAU IX

% de mycorrhizes en fonction de la saison

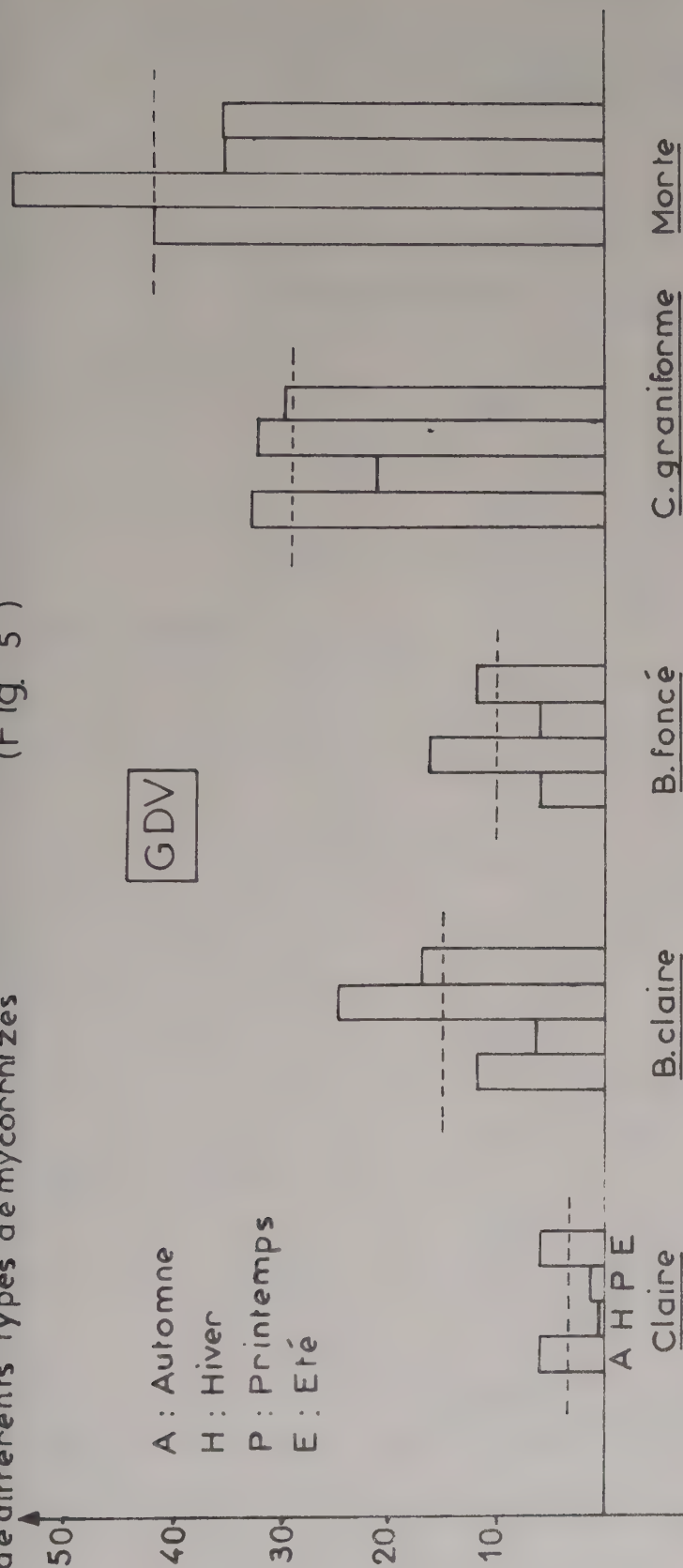
Mycorrhizes	Sol	Automne	Hiver	Printemps	Eté	Moyenne
claire	GDV	6 $\pm$ 4,1	0,3 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 2,1	3,3
	SIV	14,7 $\pm$ 11,4	7,2 $\pm$ 4,4	9,2 $\pm$ 3,4	19 $\pm$ 8,2	12,5
brun clair	GDV	12,1 $\pm$ 8,3	6,4 $\pm$ 3,5	25 $\pm$ 10	17 $\pm$ 9,1	15,2
	SIV	13,6 $\pm$ 5,5	12,5 $\pm$ 4,6	45,6 $\pm$ 12,4	22,6 $\pm$ 12,3	23,5
brun foncé	GDV	6,2 $\pm$ 5,5	16,8 $\pm$ 5,9	5,8 $\pm$ 2,9	11,9 $\pm$ 4,1	10,2
	SIV	23,8 $\pm$ 11,5	26,3 $\pm$ 7,8	11,3 $\pm$ 7,9	15,9 $\pm$ 7,2	19,2
c.gr.	GDV	33,3 $\pm$ 12,2	21,4 $\pm$ 4,8	32,5 $\pm$ 10,8	29,4 $\pm$ 12,6	29,1
	SIV	9,2 $\pm$ 5,5	8,6 $\pm$ 3,9	9 $\pm$ 5,5	10,5 $\pm$ 6,1	9,2
morte	GDV	42,4 $\pm$ 13	55,1 $\pm$ 10,2	35,4 $\pm$ 7,7	35,8 $\pm$ 8,3	42,2
	SIV	38,7 $\pm$ 9,4	45,4 $\pm$ 8,1	24,9 $\pm$ 7	32 $\pm$ 4,5	35,2

°/° de différents types de mycorrhizes

(Fig. 5)

A : Automne
H : Hiver
P : Printemps
E : Été

GDV



SIV

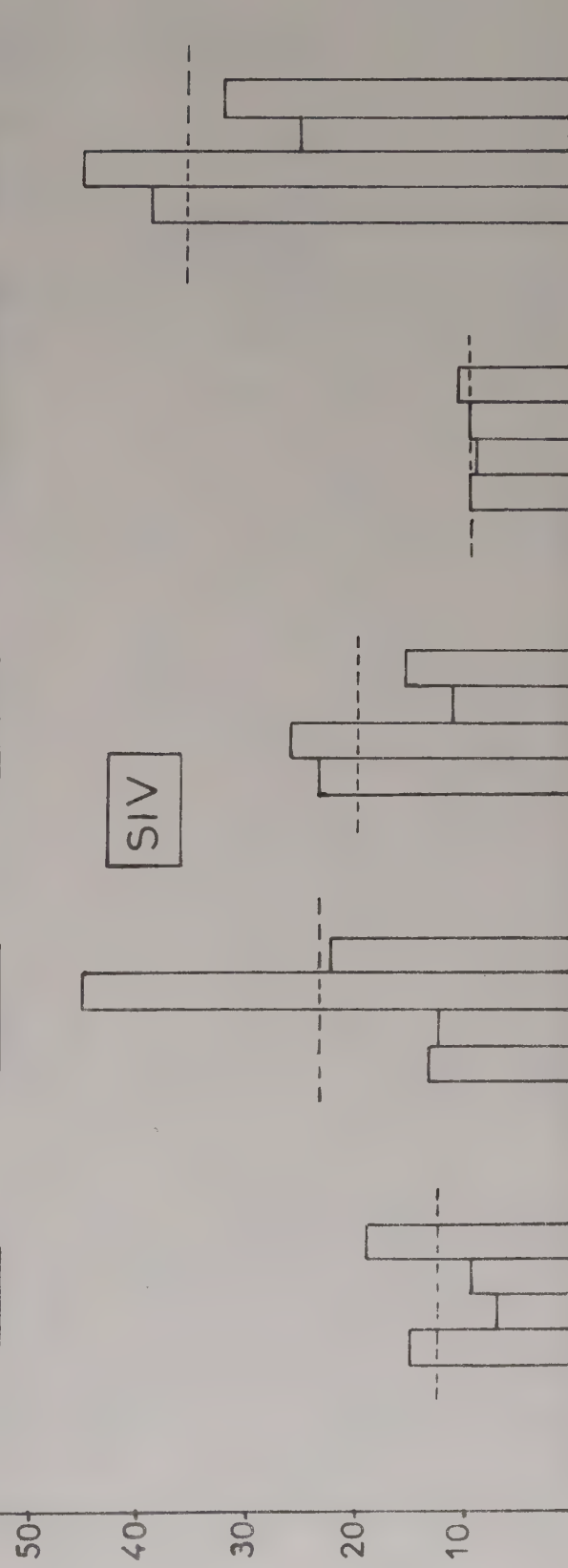


TABLEAU X

% des types de mycorrhizes à différentes profondeurs du sol

	Profondeur cm	Sol	mycorrhizes				
			clair	b. clair	b. foncé	c.gr.	mortes
Sous-mousse	0-5	SIV	9	15	29	13	34
		GDV	6	15	17	33	29
	5-10	SIV	11	13	26	11	39
		GDV	1	3	8	36	52
	10-15	SIV	4	7	22	7	60
		GDV	1	2	10	40	47
Sous-litière	0-5	SIV	12	14	32	8	34
		GDV	1	5	13	46	35
	5-10	SIV	13	8	24	10	45
		GDV	0	1	4	38	57
	10-15	SIV	4	15	28	15	35
		GDV	0	0	2	34	64

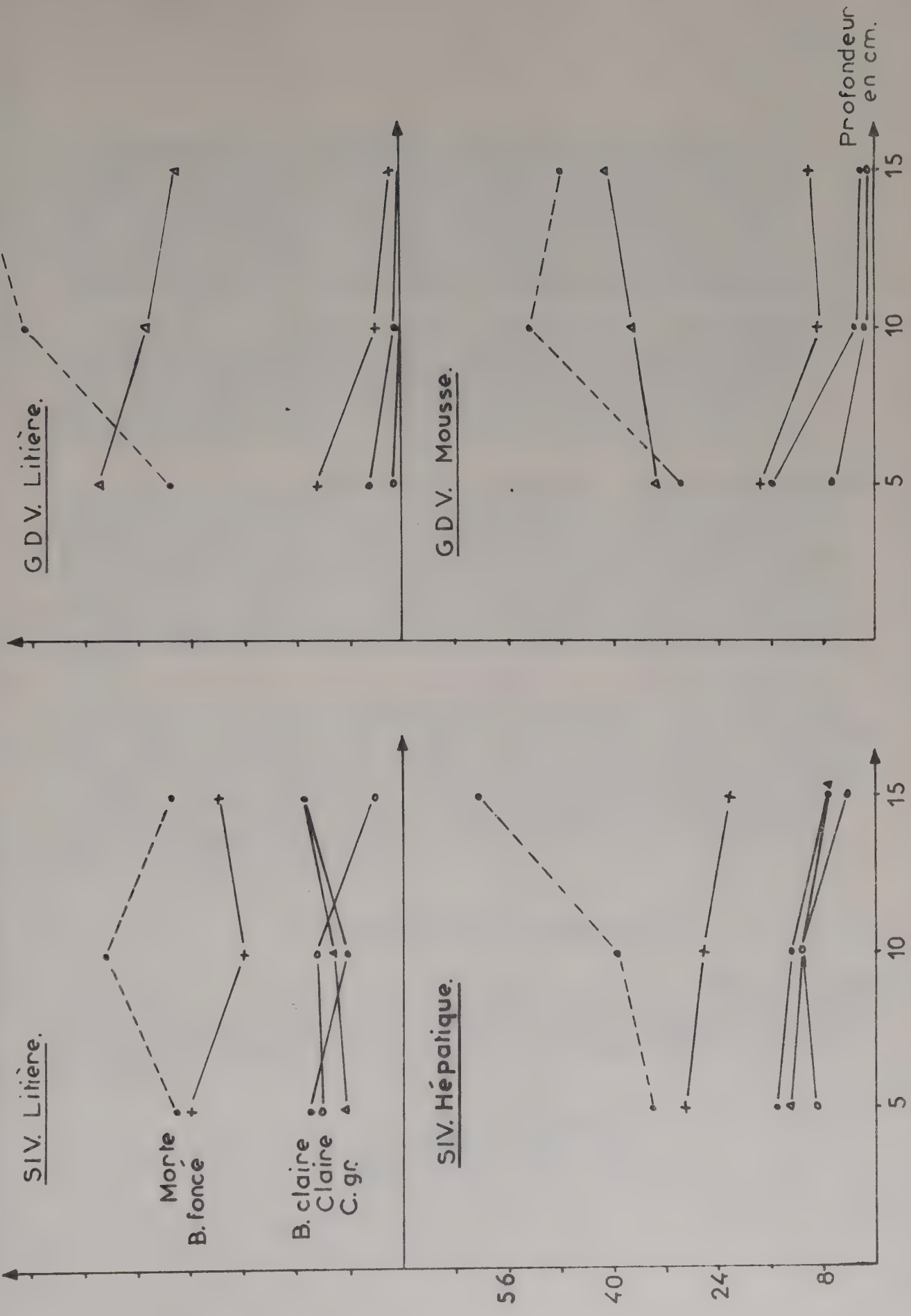
TABLEAU XI

% des mycorrhizes présentes aux trois profondeurs étudiées

Sol		Profondeur du sol en cm		
		0-5	5-10	10-15
Sous-mousse	SIV	63,9	24,5	11,6
	GDV	65,5	19,5	15
Sous-litière	SIV	46	28,5	25,5
	GDV	59	29	12

°/° de différents types de mycorrhizes.

(Fig. 6)



les proportions de différents types à la Sivrite sous litière, on peut seulement remarquer la baisse du pourcentage des mycorrhizes claires et l'augmentation de celui des mycorrhizes noires quand la profondeur croît. Dans la même station sous hépatique, la proportion des mycorrhizes claires, brun clair et noires diminue en profondeur cependant que celle des racines mortes augmente.

A Gondreville sous litière, les mycorrhizes vivantes des différents types sont plus abondantes en surface et les mycorrhizes mortes dominant en profondeur. Sous les Mousses, les résultats sont à peu près semblables, si ce n'est que *Cenococcum* augmente légèrement en profondeur.

Au cours de ce comptage, nous avons dénombré également les sclérotés de *C. graniforme* : ceux-ci ne sont présents qu'à la Sivrite. Compte-tenu du faible nombre d'échantillons, il n'est pas possible de mettre en évidence des différences significatives entre profondeurs ou entre litières. Le nombre de sclérotés par sondage est d'environ 20 soit un peu moins qu'un par ml de sol, mais ce nombre est peut-être sous-estimé en raison des difficultés d'observation.

Les données précédentes ont fait état de 4 catégories de mycorrhizes définies seulement par leur couleur. Nous avons examiné, dans chaque station, un certain nombre de mycorrhizes prélevées au hasard et appartenant à chaque catégorie pour en étudier les caractéristiques de façon plus approfondie. Celles-ci sont très constantes pour le même sol et la même catégorie et nous pensons avoir le droit de généraliser nos conclusions.

4) Description des mycorrhizes :

Pour la détermination, les racines sont prélevées, lavées et triées comme précédemment. Elles sont observées sous la loupe binoculaire et réparties dans les quatre catégories définies plus haut ; ce sont :

- Mycorrhizes claires
- Mycorrhizes brun clair
- Mycorrhizes brun foncé
- Mycorrhizes noires à *C. graniforme*

Ces différents types définis par leurs caractères extérieurs en vue des comptages doivent faire l'objet d'une observation microscopique pour confirmer leur nature d'organe symbiotique et déterminer leur place dans la classification de DOMINIK (1969).

Cet auteur en se basant sur les critères anatomiques du manteau observés sur coupe transversale et sur la couleur du manteau, a proposé une clé qui permet de classer les mycorrhizes ectotrophes en sous-types (selon les caractères anatomiques du manteau et des hyphes) et en genres (selon la couleur du manteau). Il est donc nécessaire de préparer des coupes des racines courtes pour préciser les caractères anatomiques ; nous avons recouru pour cela à la méthode décrite plus haut.

Les caractères importants pour l'utilisation de la clé de DOMINIK sont les suivants :

- présence et nature des hyphes ou autres éléments extérieurs au manteau ;
- nature prosenchymateuse ou pseudo-parenchymateuse, disposition des cellules, couleur et épaisseur du manteau ;
- aspect et profondeur de pénétration du réseau de FARTIG.

Pour les mycorrhizes formées dans la nature, la présence d'un manteau et d'un réseau de FARTIG est le critère de la mycorrhization.

a) SIVRITE : (Planche 4) :

- Mycorrhizes claires :

Ces mycorrhizes, relativement peu abondantes, sont des racines courtes, assez ramifiées et renflées. Leur couleur varie du blanc sale au fauve clair, leur aspect superficiel de lisse à velouté. Elles mesurent (0,6) - 1,8 - (4)mm de longueur.

La coupe transversale révèle un manteau peu épais formé de quelques couches d'hyphes fongiques (20 μ), prosenchymateux, hyalin.

La couche tanifère comprend 1 ou 2 assises de cellules à contenu beige-jaunâtre clair. Le réseau de FARTIG qui s'étend jusqu'à l'endoderme est unistrate, peu épais (7 μ) et hyalin ou très légèrement coloré en jaune sale.

Ces mycorrhizes appartiennent au sous-type A ou B de la classification de DOMINIK.

- Mycorrhizes brun-clair (planche 4 -Photo 1)

A la loupe : les mycorrhizes brun-clair sont assez allongées et fines (0,4) - 1,4 - (4,5)mm de longueur, cylindriques avec des rétrécissements marqués. L'extrémité jeune est blanc-sale, la partie adulte vivante brun-roux clair ou moyen, les parties âgées brun assez foncé. Elles sont généralement lisses, parfois entourées d'un mycélium hyalin ou brun-clair peu dense.

Au microscope : en coupe transversale (planche 5, photo 3), le manteau apparaît hyalin, prosenchymateux et formé d'une dizaine d'épaisseurs d'hyphes. Les filaments qui en partent sont pourvus de boucles.

Le réseau de HARTIG est hyalin, unistrate, peu épais (6,5 μ) et s'étend jusqu'à l'endoderme qui est lui aussi tanifère.

Ces mycorrhizes sont classées sous le type C dans le système de DOMINIK.

- Mycorrhizes brun-foncé :

A la loupe : ces mycorrhizes forment de petits groupes à ramification monopodiale, les mycorrhizes les plus longues pouvant porter chacune 1 ou 2 mycorrhizes latérales. Elles sont sensiblement cylindriques, avec des constriction faiblement marquées; leur surface est lisse, mate ou très légèrement brillante et leur couleur va du brun-noir dans les parties les plus âgées au brun-moyen dans l'extrémité jeune. De leur surface partent de nombreuses hyphes brun-clair. Elles mesurent (0,4) - 1,4 - (2,3)mm de longueur et de 0,2 à 0,3mm de diamètre.

Au microscope (planche 5, photo 2) : en coupe transversale, on peut distinguer de l'extérieur vers l'intérieur : un manteau de nature pseudoparenchymateuse épais de 3,9 μ composé d'une dizaine de couches d'hyphes fongiques brun-moyen vers l'extérieur, hyaline vers l'intérieur.

• un réseau de HARTIG pénétrant jusqu'à l'endoderme, unistrate, brun-moyen ; l'épaisseur de la lame fongique entre deux cellules est en moyenne de 7 μ .

A la périphérie de la racine, la couche tanifère comprend de 2 à 4 assises de cellules à contenu brun-roux clair. Certaines cellules de l'endoderme sont également chargées de tanin. Entre ces deux zones, le contenu des cellules corticales est clair et apparemment indemne de Champignon.

Ces mycorrhizes appartiennent au sous-type F de la classification de DOMINIK.

- Mycorrhizes noires à *C. graniforme* :
(planches 4 et 6) :

Dans les cas les plus typiques, ces racines sont noires et couvertes d'hyphes raides rayonnantes. Cependant, leur aspect et leur forme sont assez variables elles sont parfois lisses et brun-foncé ; cet aspect correspond probablement à l'état jeune. Ces mycorrhizes sont le plus souvent courtes et assez fines mais elles peuvent être longues et fines ou au contraire courtes et trapues ; leurs dimensions varient entre 0,6 et 2,6mm avec une moyenne de 0,8mm.

En coupe transversale, au microscope, on observe de l'extérieur vers l'intérieur :

- les hyphes du Champignon mesurant entre 3,5 et 7 μ de diamètre;

- le manteau pseudoparenchymateux brun. Il est composé de plusieurs épaisseurs d'hyphes dont la disposition est très particulière. Dans certaines zones, elles sont sphériques ou légèrement allongées dans le sens radial; entre ces zones elles s'allongent tangentiellement. Des coupes tangentielles montrent d'ailleurs que ce manteau présente des centres à cellules arrondies autour desquelles rayonnent les cellules allongées. TRAPPE (1962-1969) a montré que cette structure se trouve chez les sclérotés du Champignon et rappelle celle de la paroi des périthèces de certains *Elaphomyces*. On retrouve une structure semblable chez *Cephalotheca* (LINFELL, 1942 - In MEYER 1964) et chez *Thielavia cephalothecoides* (PALLOCF et BENNY, 1973).

L'ultrastructure des cloisons de *C. graniforme* montre d'ailleurs qu'il appartient aux Ascomycètes (TRAPPE, 1969). La partie la plus interne du manteau est parfois hyaline. L'épaisseur moyenne du manteau est de 36,7 μ .

- la couche tanifère plus ou moins épaisse comprend 1 à 3 assises de cellules à contenu brun-clair ou brun-rouge; son épaisseur est de (17,7) - 26 - (35) μ .

- le réseau de HARTIG s'étend jusqu'à l'endoderme ; il est constitué d'une couche fongique continue unistrate, parcourue par de nombreuses cloisons incomplètes visibles en coupe tangentielle. Il est hyalin ou brun mais il n'est pas possible de dire si cette coloration est due à la plante ou au Champignon. L'épaisseur de la couche fongique est de 7,1 μ en moyenne.

Autres types de Mycorrhizes : nous avons rencontré en outre rarement, à la Sivrite, des mycorrhizes de deux sortes différentes :

- mycorrhizes brun-clair, veloutées (mai 1973)

Ce sont des mycorrhizes assez renflées, trapues, decouleur brun-clair et d'aspect velouté.

Les coupes transversales montrent que cet aspect est dû à la présence de soies à l'extérieur du manteau (planche 7, planche 2). Il s'agit d'hyphes courtes légèrement renflées vers la base et plus étroites au sommet (planche 7, photo 4). Ces soies présentent donc une allure de cystides.

Le manteau est épais (dimension : 30 μ) ; il semble être formé de deux couches : l'une extérieure, brun-clair, à cellules allongées tangentiellement, et une intérieure hyaline, à cellules isodiamétriques en coupe. Sous le manteau, la couche tanifère brun-rouge clair comprend une ou deux assises de cellules.

Le réseau de HARTIG entoure toutes les cellules corticales : il est hyalin ou brun très clair, unistrate, large de 7 μ .

D'après ces caractères, ces mycorrhizes appartiennent au sous-type I de DOMINIK (1969) et plus particulièrement au genre Ih en raison de la couleur du manteau et de la forme des soies.

Les mycorrhizes de ce type perdent leur aspect velouté avec l'âge, en raison de la disparition des soies.

- mycorrhizes bleu-vert : elles sont cylindriques, parfois semblables à des mycorrhizes mortes ; les extrémités et les parties jeunes sont brun-orangé. Les parties adultes et âgées sont nettement bleu-vert.

Les coupes montrent la présence d'un manteau pseudoparenchymateux lisse, assez épais (dimension : 30μ) (planche 5, photo 1).

La couche tanifère comprend 2 ou 3 assises de cellules aplaties à contenu brun-fauve clair.

Le réseau de FARTIG pénètre jusqu'à l'endoderme ; il est brun très clair, unistrate, large de 8μ .

La coloration orangée dans la jeunesse, devenant bleu -vert avec le vieillissement chez ces mycorrhizes, rappelle les colorations du carponphore et du mycélium en culture pure de *Lactarius deliciosus* (KIFFER, com. pers.) qui pourrait bien être l'agent responsable de leur formation. La vérification de cette hyporhèse nécessiterait évidemment une expérimentation en conditions axéniques. ZAK (1969) a obtenu chez *Pseudotsuga manziiesii*, par synthèse avec *Lactarius sanguifluus* (très proche de *Lactarius deliciosus*) des mycorrhizes d'abord orangées qui deviennent graduellement vert de gris.

b) Gondreville :

- mycorrhizes claires :

A la loupe : ces mycorrhizes apparaissent assez allongées, minces et peu ramifiées (dimension : 2-4mm). Leur couleur est brun-jaune avec des plaques blanchâtres. Elles sont entourées d'un mycélium abondant, blanc sale ou jaune-brun parfois aggloméré en rhizomorphes.

Au microscope : en coupe transversale, ces mycorrhizes paraissent dépourvues de manteau ; elles sont simplement entourées par un mycélium hyalin peu dense formé d'hyphes bouclées de 1 à 2μ de diamètre (planche 8, photo 3).

La couche tanifère est formée d'une ou deux assises de cellules, très aplaties, à contenu brunrouge.

Le réseau de FARTIG qui s'étend jusqu'à l'endoderme, est unistrate, hyalin et large de 5μ .

Nous n'avons pas pu les classer selon DOMINIK.

- mycorrhizes brun-clair :

Ces mycorrhizes sont relativement courtes et assez ramifiées ; elles mesurent (0,5) - 1 - (1,5)mm. Leur couleur varie de brun-jaune clair à marron; elles présentent parfois des constrictiones peu marquées et sont lisses, entourées d'un mycélium hyalin peu abondant.

Les coupes transversales, examinées au microscope, montrent l'existence d'un manteau pseudoparenchymateux mince, brun pâle qui paraît formé de 3 à 4 couches de cellules fongiques (planche 8, photo 2).

La couche tanifère intéresse 1 ou 2 assises de cellules à contenu brun-clair.

Le réseau de FARTIG pénètre jusqu'à l'endoderme ; il est unistrate, hyalin, large de 3,5 μ .

Ces mycorrhizes dépendent du sous type F dans la classification de DOMINIK.

- mycorrhizes brun-foncé :

Ces mycorrhizes sont allongées, de forme assez irrégulière, peu ramifiées ; elles mesurent 1,8mm en moyenne.

Leur couleur est brun-foncé, presque noire sauf aux extrémités un peu plus claires ; elles sont lisses et portent de rares hyphes brun-noir.

L'examen microscopique révèle un manteau prosenchymateux hyalin, lisse, formé d'une dizaine de couches d'hyphes fongiques au maximum (planche 8, photo 1).

La couche tanifère comprend 1 à 3 assises de cellules à contenu brun rouge sombre.

Le réseau de FARTIG qui pénètre jusqu'à l'endoderme, est unistrate, large de 10 μ , brun-jaune clair.

Ces mycorrhizes sont classées sous le type B dans le système de DOMINIK.

- mycorrhizes noires à *C. graniforme* :

Les mycorrhizes même adultes et complètement noires sont souvent dépourvues d'hyphes rayonnantes ; nous pensons que celles-ci disparaissent lors du lavage et du tri car, dans cette station, le feutrage mycélien est extrêmement dense. Elles présentent les mêmes caractères microscopiques que celles de la Sivrite mais l'épaisseur de la lame fongique au niveau du réseau de HARTIG est un peu plus forte ($8,3\mu$ en moyenne).

Nous avons observé parfois la présence de légères protubérances fongiques dans les cellules corticales. C'est le seul indice d'ectoendotrophie que nous ayons rencontré chez les mycorrhizes de nos stations.

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS -

Les mycorrhizes de l'Epicéa ont été beaucoup moins étudiées que celles d'autres arbres tel que le Pin. GAUDRAY (1972) n'a fait porter ses observations que sur des plantules d'Epicéa en pépinière, et seulement de façon qualitative. Dans ces conditions, les complexes formés étaient différents de ceux des arbres adultes de nos deux stations. Il s'agissait de mycorrhizes de sous-type A.B.C.D.¹², souvent ectoendotrophes ainsi que de pseudo-mycorrhizes. MIKOLA et LAIFO (1962) ont étudié la répartition des mycorrhizes dans différents sols forestiers podzoliques en Finlande. Ces auteurs ont trouvé des densités de mycorrhizes par ml inférieures à celles de nos stations : de 31 dans la couche d'humus allant de -1 à -2cm, à 4 dans la partie inférieure du sol minéral ; mais ces chiffres ne concernent que les mycorrhizes vivantes. La classification des types mycorrhiziens choisie différant de la nôtre, il est difficile de se référer plus en détail à leurs résultats, mais nous notons que le pourcentage de mycorrhizes à *C. graniforme* varie autour de 9% dans les stations permettant une bonne croissance de l'Epicéa, alors que ce symbiote domine (pourcentage non précisé) dans une station pauvre, sèche, couverte de Callune. Ceci confirmerait les caractères de résistance aux conditions adverses mais aussi de faible efficacité de ce Champignon que nous évoquions plus haut. D'après FARLEY (1959), le pourcentage de mycorrhizes noires à *C. graniforme* augmente lorsque l'éclairement est faible et le sol pauvre. C'est précisément le cas de la plantation de Gondreville.

Les différences sont assez remarquables en ce qui concerne les types de mycorrhizes formées dans les deux stations. En particulier *C. graniforme* se comporte de façon très différente à la Sivrite où il produit des sclérotés mais moins de 10% des mycorrhizes et à Gondreville où les sclérotés sont absents mais où 1/5 des racines courtes sont infectées par ce Champignon.

C. graniforme est probablement le symbionte le plus répandu dans les zones tempérées et froides ; il supporte une large variation de pH du sol et semble spécialement abondant dans les conditions écologiques difficiles (TRAPPE, 1962). En particulier, il résiste bien à la sécheresse (MEYER, 1964). Ceci expliquerait son abondance relative à Gondreville, dans un sol peu profond sur substratum filtrant. Il est peut-être un symbionte peu efficace ; il permettrait donc la survie des arbres en conditions difficiles mais ne favoriserait pas leur bonne croissance. Ceci s'accorde donc très bien avec le médiocre rendement de la plantation de Gondreville où le sol est peu profond, filtrant et les traitements sylvicoles sont absents.

Il est plus difficile de discuter sa répartition selon la profondeur, la couverture du sol ou la saison car les résultats obtenus sont variables et parfois contradictoires. Parmi les causes de cette abondance relative de *C. graniforme* à Gondreville, on peut citer la présence de calcaire (cf. POUILLARD et DOMINIK, 1966). En effet, l'adjonction de 1 et 2% de Ca CO_3 au sol non stérilisé de la Sivrite a provoqué chez les plantules d'*Epicea* qui y ont été repiquées, la formation de mycorrhizes noires à *C. graniforme* uniquement (voir Chapitre III).

La plus grande abondance des racines courtes à Gondreville peut s'expliquer par la faible profondeur du sol qui oblige le système racinaire à se développer en surface et par la plus grande proportion des mycorrhizes mortes. On sait d'ailleurs que les mycorrhizes noires à *C. graniforme* se décomposent très lentement (MIKOLA et LAIFO, 1962).

Puisque les mycorrhizes claires sont produites en plus grand nombre au printemps à la Sivrite on peut déduire de ces observations que le renouvellement des racines courtes symbiotiques est plus important à la Sivrite qu'à Gondreville. Le sol de cette dernière station a probablement une faible activité biologique, la litière tend d'ailleurs à s'y accumuler. MEYER (1964) a déjà montré que *C. graniforme* favorise la production d'un humus brut.

Nos observations suggèrent encore un certain nombre de remarques :

- toutes les racines courtes que nous avons observées sont mycorrhizées. De nombreux chercheurs ont porté une attention particulière au taux de mycorrhization c'est-à-dire au rapport :

$$\frac{\text{nombre de racines mycorrhizées}}{\text{nombre total de racines courtes}}$$

(FARLEY, 1959), en particulier en liaison avec la fertilité du sol. Dans le cas des deux stations du plateau de Haye, comme dans celui des stations vosgiennes que nous avons pu étudier, ce taux est toujours de 100% dans les horizons sur lesquels ont porté nos observations; ce n'est donc pas à ce niveau qu'il nous faut chercher une explication aux différences de croissance entre stations. D'après WILDE et LAFOND (1967), un fort pourcentage de mycorrhization est un phénomène anormal dû aux conditions artificielles de croissance en pépinière ou au laboratoire. En ce qui concerne l'Epicéa, pour nos stations lorraines, nous ne pouvons absolument pas confirmer ce point de vue.

Bien que nous ayons désigné les différents types de mycorrhizes de deux stations par les mêmes noms selon leur couleur, les observations microscopiques montrent que ces mycorrhizes diffèrent dans les deux plantations. Les variations portent notamment sur la présence, l'épaisseur et la couleur de manteau, ainsi que sur la forme et l'aspect général des racines courtes.

Il semble que malgré les perfectionnements apportés par DOMINIK (1969) à la description et à la classification des ectomycorrhizes, la caractérisation de celles-ci soit encore une tâche ardue et qui apporte peu de renseignements aux biologistes. D'ailleurs, dans le cas de nos stations, les mycorrhizes que nous avons observées appartiennent aux sous-types différents F.A.B.H. et Ga (C. graniforme) et les rares mycorrhizes veloutées au genre Ih.

GAUDRAY (1972) a souligné les difficultés de classer les mycorrhizes en genres selon la clé de DOMINIK ; en effet, ce dernier taxon est déterminé d'après la couleur du manteau, caractère variable et presque impossible à appliquer aux mycorrhizes après le lavage auquel nous devons les soumettre.

On peut penser, en raison de ces différences que les racines courtes de nos deux stations sont mycorrhizées par des Champignons différents. Ceci concorde

d'ailleurs avec les relevés de carpophores effectués dans les deux plantations, qui ont livré des mycoflores également différentes (KIFFER, com. pers.). Quoiqu'il en soit, nous ne sommes pas en mesure de rapporter un type mycorrhizien au Champignon responsable de sa formation. En dehors du cas de *C. graniforme*, nous avons déjà dit que les mycorrhizes vertes pourraient être dues à *Lactarius deliciosus*. D'autre part, FANTANA et CENTRELLA (1967) signalent que les mycorrhizes formées par les Russules sont pourvues de cystides à la périphérie du manteau. Ceci pourrait s'appliquer aux mycorrhizes veloutées du genre *Ih* de la Sivrite, station où ces Champignons sont particulièrement abondants. Les résultats des synthèses ne nous permettent pas davantage d'identifier les Champignons symbiontes des mycorrhizes formées dans la nature.

Tout au plus pouvons-nous noter la ressemblance entre les racines courtes infectées par *Tricholoma aurantium*, *T. terreum* et *Hebeloma crustuliniforme* et les mycorrhizes claires de nos deux stations, mais l'identification ne peut aller plus loin. Nous pensons qu'il s'agit là d'une limitation inhérente aux observations morphologiques et que toute étude plus précise nécessiterait l'emploi de méthodes complexes comme la chromatographie (TPOEN D. , 1970) ou l'immunologie.

CHAPITRE III

GERMINATION ET MYCORRHIZATION DE L'EPICEA EN FONCTION DU SUBSTRAT

I - MYCORRHIZATION EN PRESENCE DE DIFFERENTS SOLS -

Les deux stations que nous avons choisies d'étudier étant situées en dehors de l'aire naturelle de l'Epicéa, nous avons pensé à comparer la croissance et la mycorrhization de plantes de même origine dans différents sols :

- ceux de deux stations d'Epicéa du plateau de Haye ;

- un sol de prairie prélevé à environ 500m, de la station de Gondreville (pH = 6,5). Ce pré est situé au milieu de friches dépourvues d'arbres forestiers; il a probablement été récupéré lui-même par défrichage ;

- un sol labouré de pH = 7,6 dans un champ près du village de Villey-le-Sec, à environ 1 500m de la station d'Epicéa. Ces deux sols agricoles appartiennent d'après GURY (Loc. cit.) à la même formation pédologique que la station d'Epicéa de Gondreville ;

- sol de Fohredberg (Bas-Rhin) : sol brun acide à Mull. Horizon A₁ de 20cm d'épaisseur, sableux. Profondeur totale : environ 1m. Roche mère = arène granitique ;

- sol de Fraize : sol brun acide. Horizon A de 10-15cm, sableux, limoneux. Horizon B de 50-60cm, sableux caillouteux. Couche C : gros cailloux sur roche mère granite gneissique à biotite ;

A - Matériel et méthodes :

Ces différents sols

sont placés dans des fioles coniques à col large, de 250ml à raison de 100g pour le sol de la Sivrite et des deux sols agricoles et 75g pour Gondreville et les deux stations vosgiennes (ces poids étant fonction de la densité du sol). L'humidité de ces sols est ramenée à la capacité de rétention.

On prépare 5 fioles de chaque sol, et dans chacune d'entre elles, on place 3 plantules axéniques âgées d'une semaine. Ces fioles sont bouchées au Parafilm et placées dans la salle de culture climatisée et éclairée (cf. Chapitre I) pendant une durée de 4 mois. A la fin de l'expérience, les plantules sont retirées, le système racinaire est lavé, les mycorrhizes et les racines courtes non mycorrhizées sont comptées sous la loupe binoculaire. Les feuilles sont également comptées et enfin la partie aérienne et la racine sont pesées séparément après séchage à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

B - Résultats et discussion :

Les valeurs numériques sont données par le tableau XII; la figure 7 met en relation les deux valeurs suivantes : poids des parties aériennes et nombre de mycorrhizes.

On n'a distingué que trois types de racines courtes :

- mycorrhizes noires à *C. graniforme*
- mycorrhizes brunes
- racines non mycorrhizées pourvues

de poils absorbants.

Ces dernières sont les seules présentes dans les deux sols agricoles qui ont aussi donné les crois-sances les plus faibles ; on peut donc en déduire que les Champignons mycorrhiziens sont absents dans ces sols.

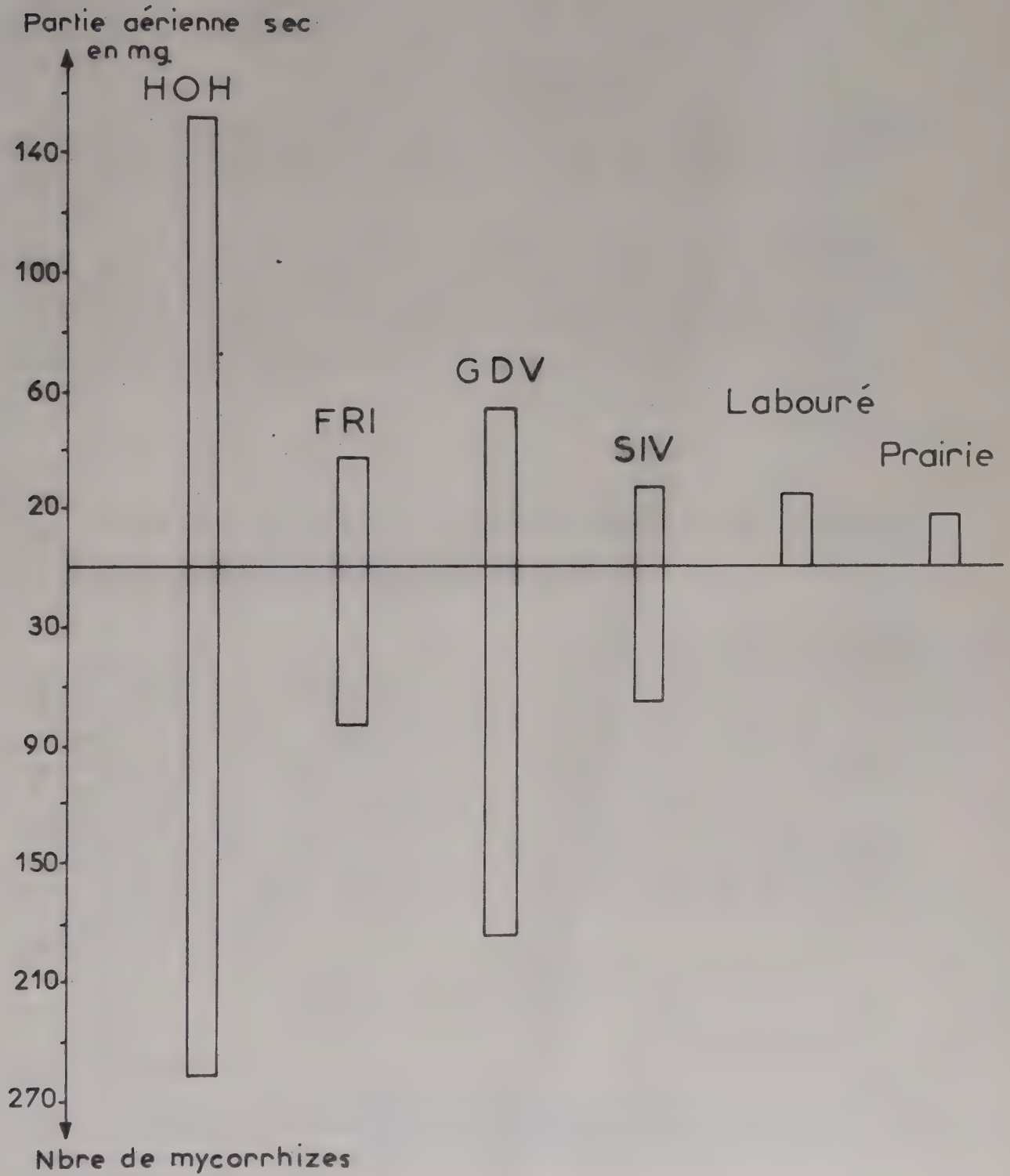
Dans les sols forestiers, la mycorrhization et la croissance sont plus ou moins importantes, mais toujours grossièrement proportionnelles (figure 7). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par de très nombreux auteurs; par exemple, les données de LAIHO (1970) concernant une expérience de mycorrhization du Pin en conditions semi-axéniques par *Paxillus involutus* sur différents substrats, permettent d'établir une relation directe entre croissance de partie aérienne et nombre de mycorrhizes. Bien entendu, une expérimentation plus poussée serait nécessaire pour séparer l'effet de la fertilité d'un sol et celui des Champignons qu'il contient.

TABLEAU XII

Sol	Age (mois)	Longueur (cm)		Poids sec (mg)		Nombre de feuilles	Nombre de mycorrhizes		Nombre de racines non mycorrhizées	S R
		Total	P. aér.	P. aér.	Racines		C. gran.	brune		
HOH	4	40,4	10,1	152,6	41,9	214,6	23	234,6	79,6	3,6
FR	4	17,7	6,4	37,2	12,4	87,6	0,6	81	23	3
GDV	4	23,25	6,7	54,6	20,7	100	187,3	0	44,3	2,6
SIV	4	18,7	6,4	27,1	9,5	71,8	3	69,6	18,4	2,8
Labouré	4	15,5	5,8	24,7	15,5	44	0	0	159	1,5
Prairie	4	15,6	6	18	5,7	37	0	0	56,5	3

HOH = Hohrodberg (Bas-Rhin) FR = Fraize (Vosges) GDV = Gondreville SIV = Sivrite

(Fig. 7)



On peut remarquer que le sol de la Sivrite, bien qu'ayant fourni des mycorrhizes n'a que peu amélioré la croissance des plantules par rapport aux témoins en sol agricole. Dans le sol de la plantation d'Epicéa de Gondreville également, le rapport :

$$\frac{\text{poids de partie aérienne}}{\text{nombre de mycorrhizes}}$$

est relativement faible. Ceci pourrait être mis en relation avec l'hypothèse déjà mentionnée de la faible efficacité de *C. graniforme* pour la croissance de la plantule.

Dans la pratique forestière, tant que l'on ne disposera pas d'une technique simple et efficace de production de plants mycorrhizés (FORTIN et PINEAU 1971, MIKOLA 1969), notre méthode pourrait permettre le choix d'un humus forestier susceptible d'assurer en pépinière une bonne croissance liée à une mycorrhization des jeunes semis.

II - INFLUENCE DES QUELQUES FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA MYCORRHIZATION DES PLANTES -

L'expérience décrite au paragraphe précédent nous a montré que des sols différents placés dans des conditions semblables, avaient des influences différentes sur la croissance et la mycorrhization des plantules initialement axéniques qui y sont cultivées. Le comportement de *C. graniforme* était particulièrement remarquable à cet égard dans les sols de la Sivrite et de Gondreville. Nous avons, dans une deuxième expérience, modifié les caractéristiques d'un seul sol afin d'étudier l'influence de ces modifications sur la croissance et la mycorrhization des plantules. Nous avons choisi le sol lessivé de la Sivrite dont il était facile de modifier le pH et le taux de matière organique.

A - Matériel et méthodes :

6 séries de fioles

sont préparées :

- 3 fioles contenant chacune 100g de sol dont l'humidité est amenée à la capacité de rétention ; cette série représente les témoins de l'expérience ;

- de rétention ;
 - 3 fioles avec sol à 1/2 de la capacité
- de rétention ;
 - 3 fioles avec sol à 2 fois la capacité
- recevant chacune 1g de Ca CO_3 - pH final : 8,1 ;
 - 3 fioles à la capacité de rétention
- avec 2g de Ca CO_3 - pH final : 8,2 ;
 - 3 fioles à la capacité de rétention
- additionnées de 5g de sciure de Hêtre.

3 plantules, âgées d'une semaine, axéniques, obtenues par germination sur eau gélosée, sont repiquées dans chaque fiole. Les fioles sont bouchées au Parafilm, placées dans la salle climatisée et incubées pendant 4 mois. A la fin de l'expérience, les plantules sont retirées du sol et les observations suivantes sont effectuées :

- nombre et types de mycorrhizes
- nombre de racines non mycorrhizées
- longueur totale des plantules et longueur de la partie aérienne
- nombre de feuilles
- poids des parties aériennes et des racines

B - Résultats et discussion :

Les résultats sont présentés dans le tableau XIII et la figure 8.

La modification des conditions deculture a une influence très remarquable sur la croissance et la mycorrhization des plantules :

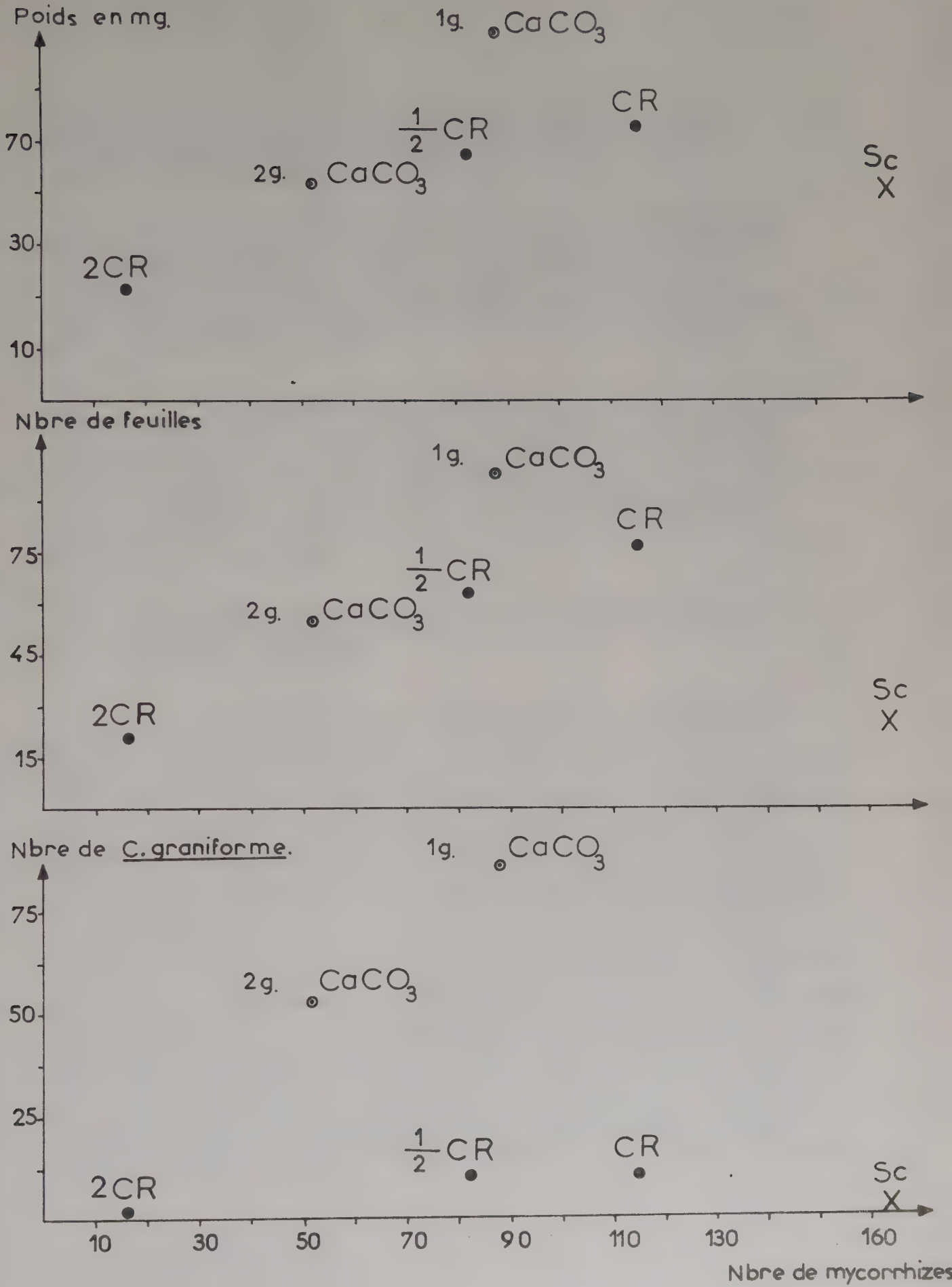
- le fait le plus frappant est qu'en présence de carbonate de calcium, *C. graniforme* est seul capable de mycorrhizer les racines ;
- le nombre de mycorrhizes décroît légèrement en présence de calcium.
- le nombre de mycorrhizes décroît légèrement en sol sec (1/2 de la capacité de rétention) et fortement en

TABLEAU XIII

	Age (mois)	Nombre de feuilles	Poids (mg)	Nombre de mycorrhizes noires	Nombre total de mycorrhizes	Nombre de racines non mycorrhizées	Longueur (cm)
1/2 C.R.	4	63 ± 25	48,2 ± 16	10 ± 3	73 ± 28	23 ± 11	23 ± 7
C.R.	4	76 ± 21	53,3 ± 3	10 ± 4	115 ± 25	22 ± 7	14 ± 3
2 C.R.	4	21 ± 3	21,2 ± 5	0,3	16 ± 8	7 ± 3	10 ± 2
1g Ca CO ₃	4	101 ± 3	54,4 ± 6	86 ± 6	88 ± 10	23 ± 4	18 ± 4
2g Ca CO ₃	4	55 ± 4	42,3 ± 2	52 ± 3	52 ± 3	15 ± 5	14 ± 4
5g sciure	4	24 ± 2	40 ± 5	1	163 ± 35	0	24 ± 6

C.R. = Capacité de rétention.

(Fig. 8)



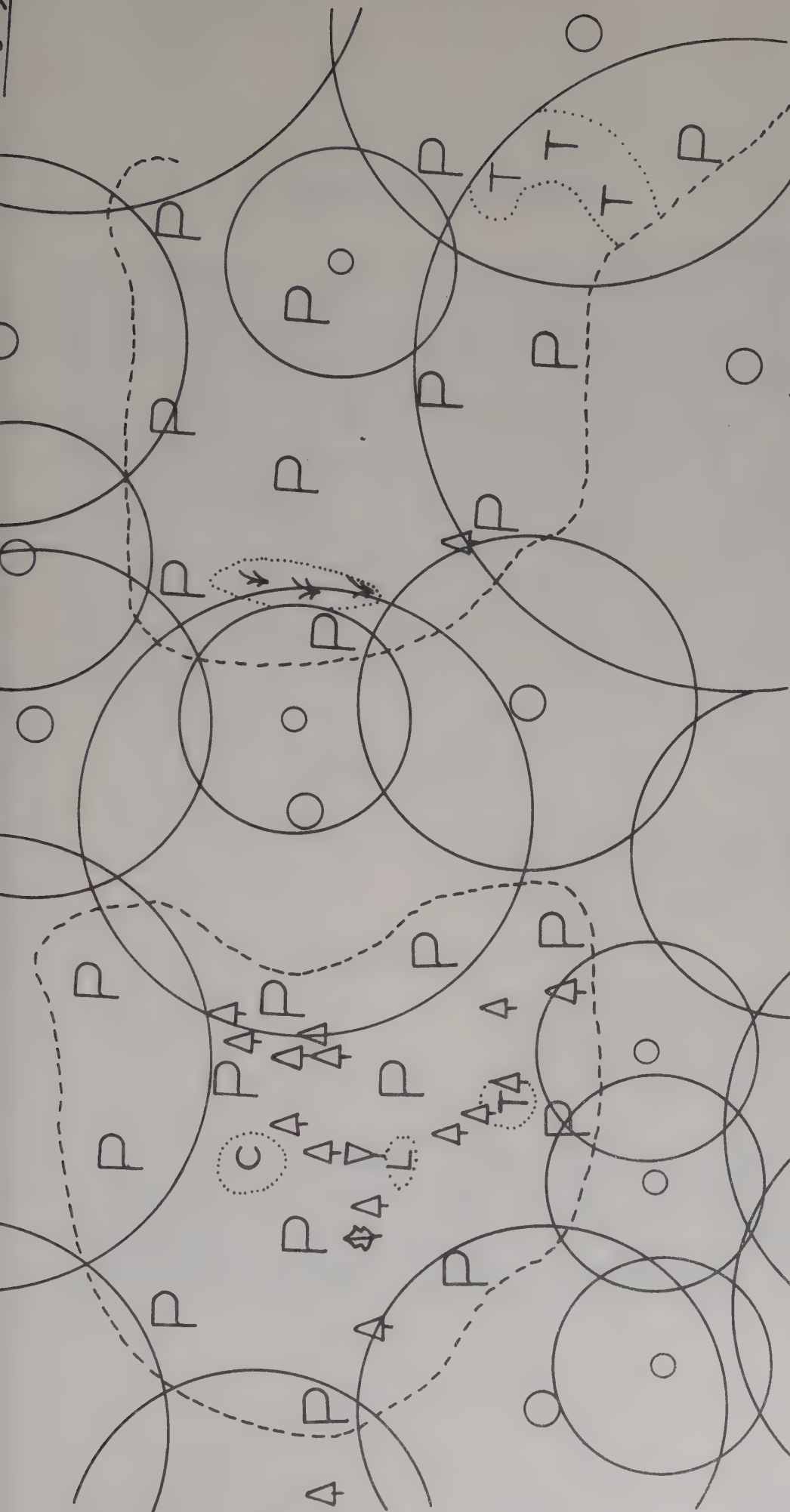
sol humide (2 fois de la capacité de rétention). Les mycorrhizes noires ne sont pas plus nombreuses dans le sol sec que dans les témoins, mais pratiquement absentes du sol saturé ;

- dans toute cette série se vérifie à peu près la règle de proportionalité entre croissance de plantules et nombre de mycorrhizes, comme le montre la figure 8. Au contraire, l'adjonction de sciure au sol a provoqué la formation d'un grand nombre de mycorrhizes mais la croissance pondérale et le nombre de feuilles sont relativement faibles.

D'après ces résultats, il semble donc que le calcaire (et le pH alcalin) favorisent *C. graniforme*, ce qui pourrait expliquer son importance dans la station de Gondreville. L'effet défavorable d'un excès d'humidité sur la formation des mycorrhizes est confirmé. L'action plus complexe de l'apport de sciure serait intéressante à étudier plus en détail du point de vue théorique et du point de vue pratique.

III - GERMINATION ET MYCORRHIZATION EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES LITIÈRES -

Nous avons mentionné dans le chapitre II l'absence de régénération à la Sivrite et l'existence de petits semis dans les éclaircies à Gondreville. Nous avons fait des relevés de végétation au niveau de ces zones ce qui nous permet de mettre en évidence une certaine relation entre la présence de la Mousse *Pseudoscleropodium purum* et celle des jeunes semis (figure 9). Ces derniers sont absents des zones sombres où le sol est seulement recouvert de litière d'*Epicéa*, aussi bien que des lisières très éclairées, colonisées par des Graminées. Ces relevés de terrain ne permettent pas de discriminer les différentes causes possibles de ce phénomène : lumière - température - humidité - substances chimiques excrétées par les végétaux.... Par exemple, l'importance de la strate muscinale pour le maintien d'une humidité favorable à la germination des graines est une hypothèse qui vient immédiatement à l'esprit. Nous avons pensé qu'une expérimentation simple, au laboratoire, pourrait nous permettre de séparer les influences des facteurs physiques et chimiques. En plaçant les différents sols et litières dans les mêmes conditions, nous pouvons étudier l'action des facteurs chimiques seuls, les facteurs physiques étant égalisés.



Régénérations:

Δ Epicea

▽ Pin

♣ Chêne

Thuidium tamariscifolium

Lophocolea bidentata

Graminées

Epiceas adultes

Pseudoscleropodium purum

Ctenidium molluscum

1 m

A - Matériel et méthodes :

Les échantillons de sol sont prélevés à l'aide d'une sonde cylindrique, sous forme de carottes de 85mm de diamètre et de 100mm de hauteur. Ces carottes sont placées dans des pots de terre cuite de 10cm de diamètre; certains échantillons sont débarassés de leur litière ou strate muscinale. Les sols sont humectés à leur capacité de rétention, puis 15 graines d'*Epicéa* sont placées à la surface de chaque pot ; elles n'ont subi aucun prétraitement ni stérilisation. Les pots sont alors recouverts d'un couvercle de boîte de Pétri et placés à la température ambiante du laboratoire, sous éclairage de 5 000lux, 16 heures par jour. Ces pots sont régulièrement examinés et le nombre de graines germées est noté. Ces essais de germination sont poursuivis pendant 20 jours. En outre, lorsque les résultats sont positifs, l'expérience est poursuivie pendant 4 mois pour observer le devenir des plantules notamment en ce qui concerne le développement éventuel des mycorrhizes. Les substrats étudiés de cette manière sont les suivants :

LA SIVRITE :

- sol avec litière d'*Epicéa*
- même sol débarassé de sa litière
- sol avec *Plagiochila asplenioïdes*
- même sol débarassé de l'*Hépatique*.

GONDREVILLE :

- sol avec litière
- même sol débarassé de sa litière
- sol avec Mousse : *Ps. purum*
- même sol débarassé de la Mousse

Parallèlement, l'action des mêmes litières et Bryophytes est étudiée après une percolation : sur 5g de Mousse ou de litière, nous faisons s'écouler 1 litre d'eau distillée en 24 heures. Cette opération est destinée à éliminer les substances hydrosolubles. On y a ajouté la litière fraîche, consistant en aiguilles d'*Epicéa* prélevées sur un arbre abattu (non tombées au sol), lavée comme précédemment.

Ces différentes litières sont placées en pots de terre cuite, sur 400g de sable de Fontainebleau humecté à sa capacité de rétention ; des pots contenant seulement du sable de Fontainebleau constituent les témoins. La levée des graines sur ces pots est observée comme précédemment.

B - Résultats et discussion :

1) Germination :

Les pourcentages de germination sont fournis par le tableau XIV.

L'évolution de la germination en fonction du temps est exprimée sous forme graphique dans la figure 10. La germination est totalement inhibée par les litières d'Epicéa des deux stations et l'Hépatique de la Sivrite. Les aiguilles fraîches lavées sont également inhibitrices. Les sols pris sous litière d'Epicéa dans les deux stations et sous Hépatique à la Sivrite et débarrassées de celles-ci permettent une germination lente et médiocre ; en outre, il faut signaler que les plantules ne survivent pas dans les sols sous litière d'Epicéa, mais qu'elles meurent environ un mois après le début de l'expérience. Les substrats les plus favorables à la germination et à la survie sont les suivants :

- sable pur
- Mousse lavée
- sol sous Mousse
- Mousse en place
- sol de Sivrite sous Hépatique

Ces observations nous semblent concorder parfaitement avec celles effectuées dans la nature : une graine qui tombe sur un sol recouvert de litière d'Epicéa ou d'Hépatique ne peut pas germer. Puisque dans la nature il n'existe pas de surfaces tout à fait nues, seules les graines qui tombent sur les Mousses peuvent germer et poursuivre leur développement. Nous ne savons pas expliquer actuellement la différence de germination entre la Mousse en place et la Mousse lavée. Peut-être y-a-t-il dans le deuxième cas élimination de substances inhibitrices aux fortes concentrations qui doivent être présentes à la surface de la Mousse non lavée.

TABLEAU XIV

% des graines germées sur différentes litières

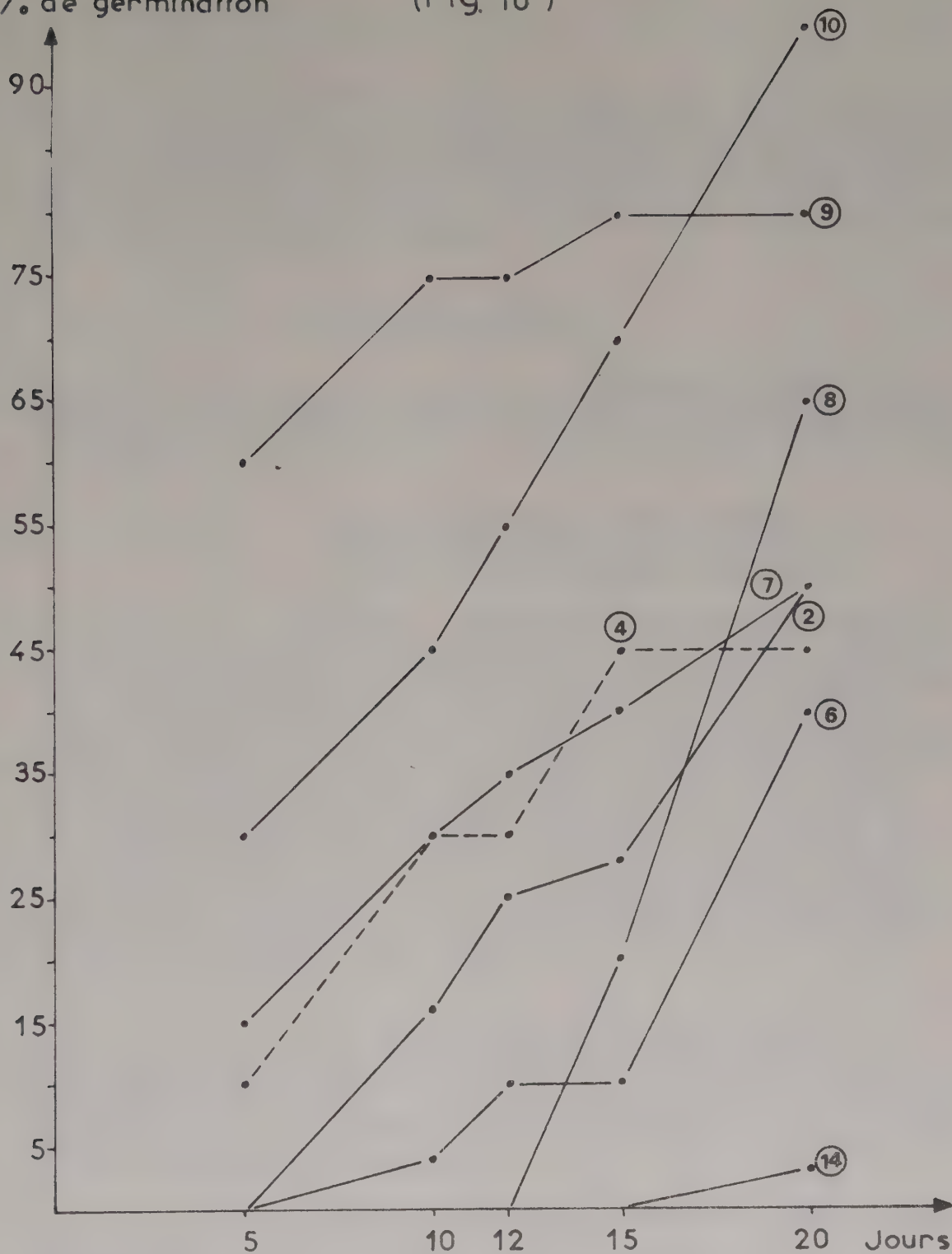
Substrat \ Jours		5	10	12	15	20
1	SIV + litière	0	0	0	0	0
2	SIV sous litière	0	16	25	28	50
3	SIV + Hépatique	0	0	0	0	0
4	SIV sous Hépatique	10	30	30	45	45
5	GDV + litière	0	0	0	0	0
6	GDV sous litière	0	4	10	10	40
7	GDV + Mousse	15	30	35	40	50
8	GDV sous Mousse	0	0	0	20	65
9	Sable de Fontainebleau Témoin	60	75	75	80	80
10	Sable + Mousse lavée GDV	30	45	55	70	95
11	Sable + litière lavée GDV	0	0	0	0	0
12	Sable + litière fraîche lavée - GDV	0	0	0	0	0
13	Sable + Hépatique lavée SIV	0	0	0	0	0
14	Sable + litière lavée SIV	0	0	0	0	3

GDV = Sol de Gondreville

SIV = Sol de la Sivrite

°/° de germination

(Fig. 10)



Germination des graines d'Epicéa sur
différentes litières.

PIUSSI (1970) et PIUSSI et SULLI (1972) étudiant les problèmes de la régénération chez *Picea* ont montré que la germination était plus rapide sur substrat minéral que sur substrat organique. La litière a une action inhibitrice sur la germination, mais cet effet n'est pas retrouvé avec des extraits de litière.

2) Mycorrhization :-

Comme nous l'avons dit plus haut, nous avons laissé pousser les plantules dans les substrats qui avaient permis leur germination et leur survie, c'est-à-dire :

- sol de Gondreville avec Mousse
- sol de Gondreville sans Mousse
- sol de la Sivrite sous Hépatique.

En outre, nous avons pu constater que les sols de la Sivrite et de Gondreville sous litière permettaient la survie et un développement normal à condition que les horizons superficiels et profonds soient mélangés : c'est l'expérience décrite au début de ce chapitre, expérience où nous avons étudié la mycorrhization de plantules en fioles contenant différents sols non stériles. Aussi avons-nous placé des plantules, préalablement germées sur eau gélosée, en pots contenant les sols de la Sivrite et de Gondreville, prélevés sous litière et mélangés comme précédemment. Dans ces conditions, les plantules se sont également développées, ont survécu et ont formé des mycorrhizes. Ces résultats ont été ajoutés au tableau XV qui révèle les remarques suivantes :

- *C. graniforme* forme toujours un pourcentage important des mycorrhizes dans la station de Gondreville et beaucoup plus faible à la Sivrite. Cependant, en présence de Mousses, le spectre mycorrhizien paraît plus favorable : *C. graniforme* n'est plus dominant et les plantules sont plus vigoureuses.

- Il y a, ici encore, une certaine relation entre nombre de mycorrhizes et développement des plantules (figure 11).

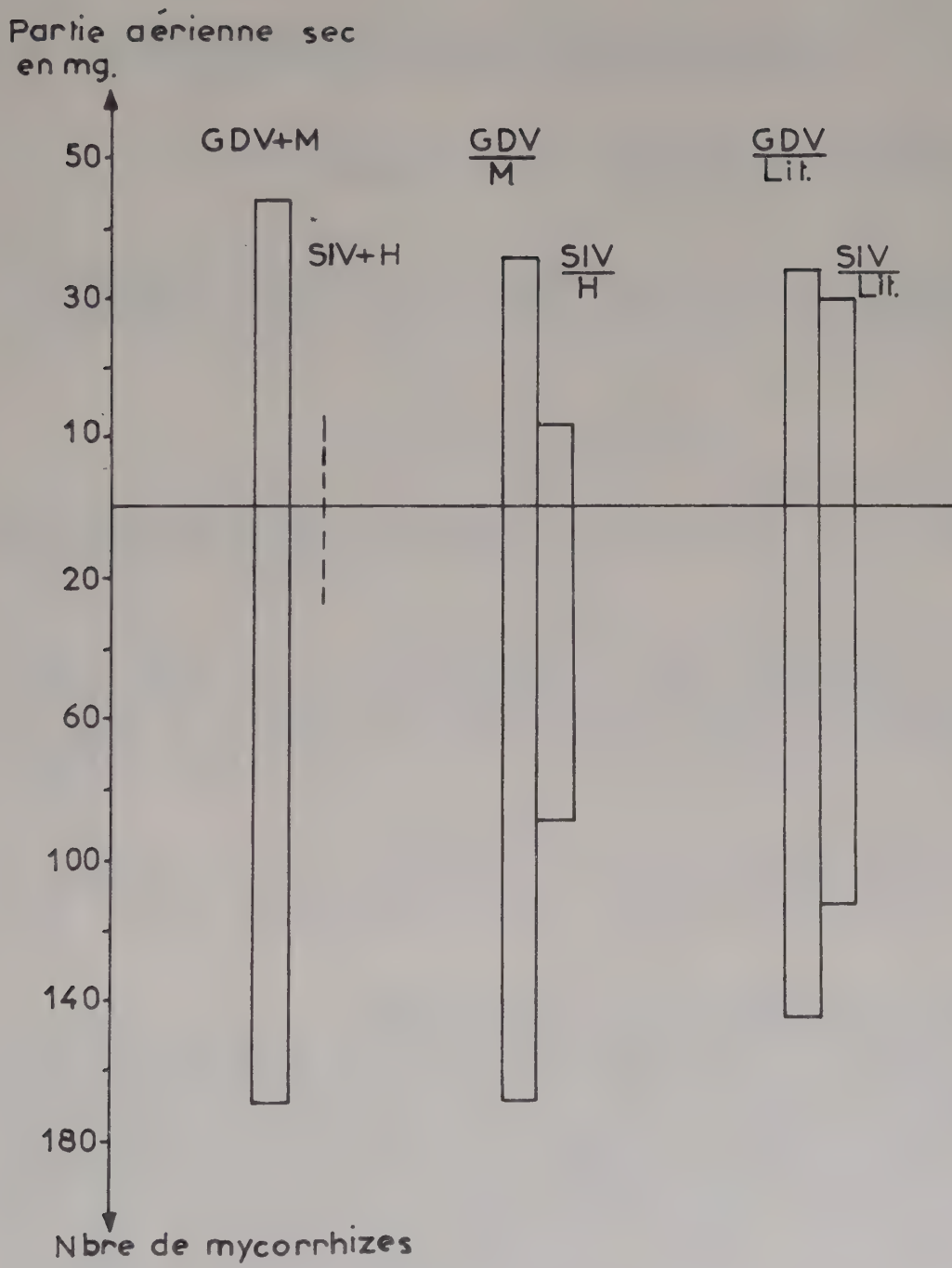
TABLEAU XV

Sol	Poids P. aérienne (mg)	Poids de racines (mg)	Nombre de mycorrhizes noires(C. <i>gt.</i> .)	Nombre total de mycorrhizes	Nombre de racines non mycorrhizées	Longueur de plante (cm)	$\frac{S}{R}$
GDV + Mousse	43,8	22,8	73	171	17	19	1,9
GDV sous Mousse	35,6	14,6	97	169	7	20	2,4
GDV sous litière	34,2	16,6	108	146	0	21	2
SIV sous Hépatique	11,8	9,2	22	70	35	19	1,2
SIV sous litière	28,9	15,5	13	114	10	23	1,8

SIV = Sol de la Sivrite

GDV = Sol de Gondreville

(Fig. 11)



- le rapport S/R est le plus faible dans le cas des plantules les moins développées : celles de la Si-vrite sous Hépatique, qui sont aussi les moins mycorrhizées.

IV - GERMINATION DES GRAINES D'EPICEA IN VITRO -

A - Germination sur extraits des litières :

Afin d'essayer d'expliquer la présence ou l'absence de régénération de l'Epicéa selon la nature des litières, nous avons fait germer des graines sur des extraits gélosés de celles-ci.

1) Matériel et méthodes :

Les extraits de *Pseudoscleropodium purum* et de litière de *P. abies* sont préparés de la façon suivante :

récolte : La strate muscinale est collectée dans des plages où elle est bien développée, à Gondreville ; elle est rapportée au laboratoire et triée de façon à ne garder que des brins de Mousse appartenant aux fractions "vert" et "brun dressé" définies par KILBERTUS (1970).

La litière de la même station est décapée à la main : nous ne prélevons que la partie récemment tombée, non encore agglomérée par le feutrage mycélien.

extr action : 5g de matériel végétal sec sont soumis à une agitation mécanique dans 100ml d'eau distillée pendant 4 heures à la température du laboratoire. Ces extraits sont stérilisés par filtration (Millipore), solidifiés par adjonction d'une quantité égale d'eau distillée gélosée à 4%, stérile, et coulés en boîtes de Pétri. On prépare de plus des boîtes témoins contenant de l'eau gélosée stérile à 2%. 10 graines d'Epicéa, prétraitées et stérilisées par H_2O_2 comme précédemment, sont déposées sur chaque boîte. Le nombre de graines germées est noté après 5, 9, 12 jours. A ce moment, les plantules sont mesurées.

2) Résultats :

- germination :

ils sont consignés
dans le tableau suivant :

Jours	Traitement	Moyenne [†]
5	Témoins	57 $\pm$ 10
	Mousse	75 $\pm$ 11
	Litière	57,5 $\pm$ 23
9	Témoins	86 $\pm$ 14
	Mousse	86 $\pm$ 8
	Litière	80 $\pm$ 16

[†] Moyenne de 80 graines de chaque traitement.

Après 5 jours, les différences entre témoins et Mousse sont statistiquement significatives au seuil de 0,05 : le Bryophyte a un effet stimulant sur la germination des graines d'Epicéa. Par contre, dans le cas des litières d'Epicéa, les substances inhibitrices ne sont peut-être pas en quantité suffisante pour freiner le développement des graines. Dans d'autres essais, un extrait de litière plus concentré a provoqué une inhibition marquée de la germination. D'après KILBERTUS (Comm. pers.) un extrait concentré de Mousse n'est pas inhibiteur.

Après 9 jours, les moyennes sont voisines : l'action de l'extrait de Bryophyte, aux concentrations utilisées, serait essentiellement d'accélérer le processus de germination.

- taille des racines :

A la fin de l'expérience (12 jours), nous avons mesuré la longueur des racines pour essayer de préciser l'action des litières sur les plantules, comme l'avaient fait WINTER et SCHONBECK (1953). Les résultats se trouvent dans le tableau ci-dessous :

T	Longueur des racines après 12 jours	M
	10 - 9 - 9,5 - 8 - 8 - 8,5 - 9,5 - 8 - 7 - 9 - 10 - 9 - 10 - 10,5 - 8,5 - 7 - 9 - 7,5 - 10,5 - 9.	8,9
M	10 - 9 - 8,5 - 11 - 9 - 9,5 - 8 - 8 - 8,5 - 9 - 8,5 - 9 - 8,5 - 8,5 - 7,5 - 8,5 - 9,5 - 9 - 10 - 7 - 8.	8,8
L	8 - 7 - 7,5 - 7,5 - 8 - 8 - 8 - 5 - 7 - 7 - 7 - 7,5 - 7 - 9 - 3 - 4 - 7 - 8 - 8 - 7 - 6	6,9

T = témoins

M = Mousse

L = Litière

L'extrait de Mousse n'augmente pas la taille des racines par rapport au témoin. Au contraire, l'extrait de litière d'Épicéa réduit la longueur des racines d'une façon remarquable.

Ces différents résultats nous semblent expliquer très bien les données obtenues dans la nature et au laboratoire.

- les extraits aqueux des aiguilles d'Épicéa ralentissent à faible concentration la croissance des racines des plantules ; à forte concentration, ils inhibent la germination.

- les extraits de la Mousse accélèrent la germination et permettent un allongement normal de la racine.

Remarquons que, dans les expériences, nous éliminons totalement les facteurs physiques et microbiologiques du problème de la régénération. Si l'on considère qu'il n'existe pas dans la nature de substrat "neutre", comparable à nos témoins sur eau gélosée, on peut schématiser ainsi le sort d'une graine libérée d'un cône ;

- ou bien elle tombe sur la litière d'*Epicea* qui inhibe sa germination dans la plupart des cas ou ralentit sa croissance, ce qui est probablement défavorable au point de vue écologique.

- ou bien elle tombe dans la Mousse qui accélère sa germination et lui procure une bonne croissance.

Comme cette accélération de la germination nous paraît être un facteur favorisant important, nous avons cherché à savoir ce qui, dans l'extrait de Bryophyte, était responsable de ce phénomène.

P - Germination sur différentes fractions d'extrait de Mousse :

1) Obtention des fractions :

Nous avons préparé un litre d'extrait de *Ps. purum* par la méthode exposée précédemment. Ce sont donc 50g de Mousse sèche à l'air qui ont été traités. Cet extrait est réduit dans un évaporateur rotatif, à +40°C, sous vide partiel à un volume d'environ 50ml. Cet extrait concentré est alors lyophilisé. Il fournit 1,2268g de produit sec. Par la suite, les différentes fractions de l'extrait seront préparées de façon à présenter la même concentration que celle de l'extrait complet.

Fractionnement de l'extrait : 0,06g d'extrait sont repris dans 10ml d'eau distillée et séparés en trois fractions par passage sur colonnes de résines cationique et anionique :

- la résine cationique retient les acides aminés. Ceux-ci sont récupérés par élution d'ammoniaque (50ml à 13,5%). L'éluat est concentré sous vide à 40°C, ce qui élimine l'ammoniaque. Le résidu sec est repris par 1,5ml d'eau distillée. Cette solution est conservée au congélateur jusqu'à utilisation.

- la solution de Mousse qui a précédemment traversé la colonne de résine cationique est maintenant passée sur une colonne de résine anionique, qui retient les acides organiques. L'élution est effectuée par 50ml d'acide formique 6N. L'éluat est concentré et repris comme plus haut.

- la solution qui reste après la traversée des deux colonnes contient les substances neutres, donc les sucres. Elle est concentrée et remise en solution comme plus haut.

La deuxième fraction, celle des acides organiques, contient en mélange les acides phénols et les acides aliphatiques. Pour étudier l'action des acides phénols seuls, nous les avons séparés de l'extrait total de la manière suivante :

0,30gm d'extrait lyophilisé sont dissous dans 75ml d'eau distillée. Les pigments et matières grasses sont d'abord éliminés par extraction 5 fois répétée, par l'éther de pétrole. La solution aqueuse est concentrée pour chasser toute trace d'éther puis acidifiée jusqu'à pH 1-2 par HCl 2N. Les acides phénols libres sont extraits par l'acétate d'éthyle, à 10 reprises. L'acétate d'éthyle est évaporé sous vide à +40°C et l'extrait sec est repris par 1ml de méthanol.

Nous possédons maintenant 4 fractions de l'extrait de Mousse :

- acides aminés
- acides organiques (aliphatiques et aromatiques) donc entre autre les acides phénols
- les acides phénols seuls
- fraction neutre contenant notamment les sucres.

Ces 4 fractions sont mises en solution dans l'eau gélosée, ce qui donne finalement la même concentration que l'extrait initial, et coulées en boîte de Pétri. Leur action sur la germination des graines d'Épicéa est étudiée comme précédemment (voir p.60) en comparaison avec des boîtes témoins d'eau gélosée.

2) Résultats :

Ils sont exprimés sous forme graphique par les courbes de la figure 12 qui représentent les pourcentages des graines germées en fonction du temps.

Les fractions acides phénols et acides aminés donnent des résultats légèrement plus faibles que les témoins. La fraction acides organiques est également légèrement inhibitrice jusqu'à 90 heures, mais à la fin de l'expérience (110 heures), le taux de germination est au contraire un peu plus élevé que celui des témoins. Enfin la fraction neutre contenant les sucres favorise sensiblement et constamment la germination.

C - Germination sur des cultures des Champignons mycorrhiziens :

Nous avons constaté d'après les résultats du paragraphe B qu'il semble exister certaines relations entre germination des graines et mycorrhization ultérieure des plantules sur substrats naturels. MOUZAIN (1971) a montré que l'enrobage des graines de Pin maritime avec du mycélium de *Boletus bovinus* réduisait le taux de germination de 1/3 par rapport aux témoins ; *Trichoderma viride* le réduit de 2/3. Les filtrats de culture des mêmes Champignons ont une action inverse, les pourcentages de germination croissant dans l'ordre : témoin, filtrat de *T. viride*, filtrat de *Boletus bovinus*. Pour notre part, nous avons choisi d'étudier l'influence de deux de nos souches mycorrhiziennes sur la germination des graines de *P. abies*.

1) Matériel et méthodes :

Les deux Champignons à tester, *Hebeloma crustuliniforme* et *Cenococcum graniforme*, sont ensemencés sous forme de broyats en boîte de Pétri sur milieu à l'extrait de malt gélosé. Après 10 jours, les cultures étant bien développées, 15 graines prétraitées et stérilisées par P_2O_5 sont déposées à la surface de chaque boîte.

Trois répétitions sont faites pour chaque Champignon; trois témoins contenant le milieu stérile sont également préparés. Les nombres des graines germées sont notés après 3, 5 et 8 jours. En outre, après 12 jours, 5 plantules sont prélevées au hasard de chaque boîte, la longueur de leurs radicules est mesurée et le poids de chaque plantule déterminé après séchage à 105°C.

TABLEAU XVI

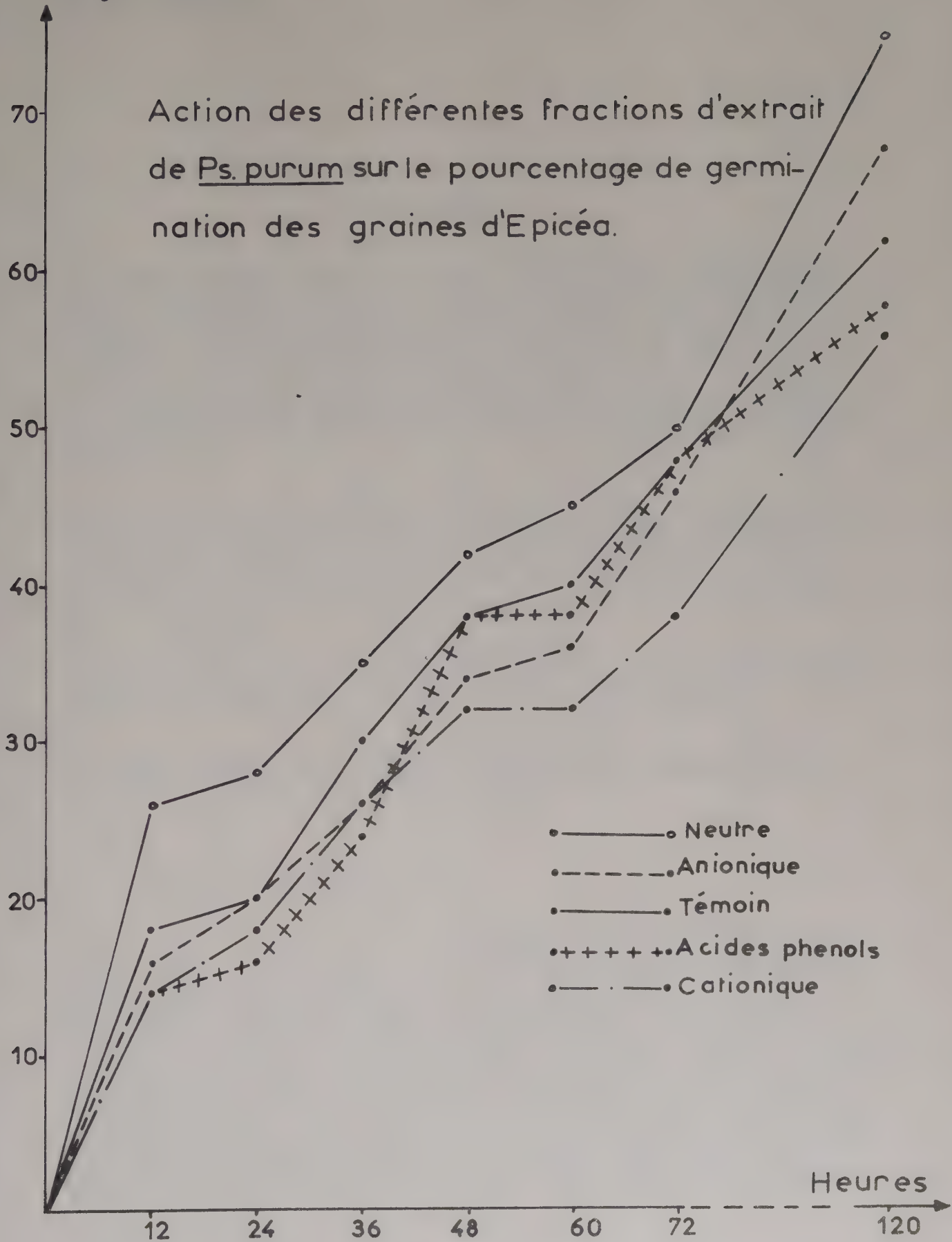
Heure Fraction	12	24	36	48	60	72	120
T	18	20	30	38	40	48	62
Neutre	26	28	35	42	45	50	75
Cationique	14	18	26	32	32	38	56
Anionique	16	20	26	34	36	46	68
Acides Phénols	14	16	24	38	38	48	58

% de germination des graines d'Epicéa
sur différentes fractions d'extrait de Mousse

(Fig. 12)

°/° de germination

Action des différentes fractions d'extrait
de Ps. purum sur le pourcentage de germi-
nation des graines d'Epicéa.



2) Résultats :

La figure 13 représente la germination des graines en fonction du temps : la présence des Champignons accélère la germination et, dans les conditions de notre expérience, permet la levée de toutes les semences. Les "témoins" germent moins vite et moins complètement. Les moyennes des longueurs de radicules et poids des plantules se trouvent dans le tableau XVII : ici encore la germination en présence de Champignon pourrait avantager les plantules qui sont légèrement plus développées que les témoins.

Cette simple expérience, limitée dans son but comme dans ses moyens, était destinée à nous renseigner sur l'influence éventuelle de deux Champignons mycorrhizogènes de nos stations sur la germination des graines d'Epicéa. Il faut remarquer que le milieu utilisé n'est pas très favorable à la levée des semences.

Dans ces conditions, les graines germent mieux en présence de deux symbiontes. Elles ont donné naissance à des plantules d'aspect tout à fait normal.

Nous ne confirmons donc pas, dans le cas de *P. abies*, les résultats obtenus par BJORKMAN (1970) et MOUZAIN (1971) chez divers Pins.

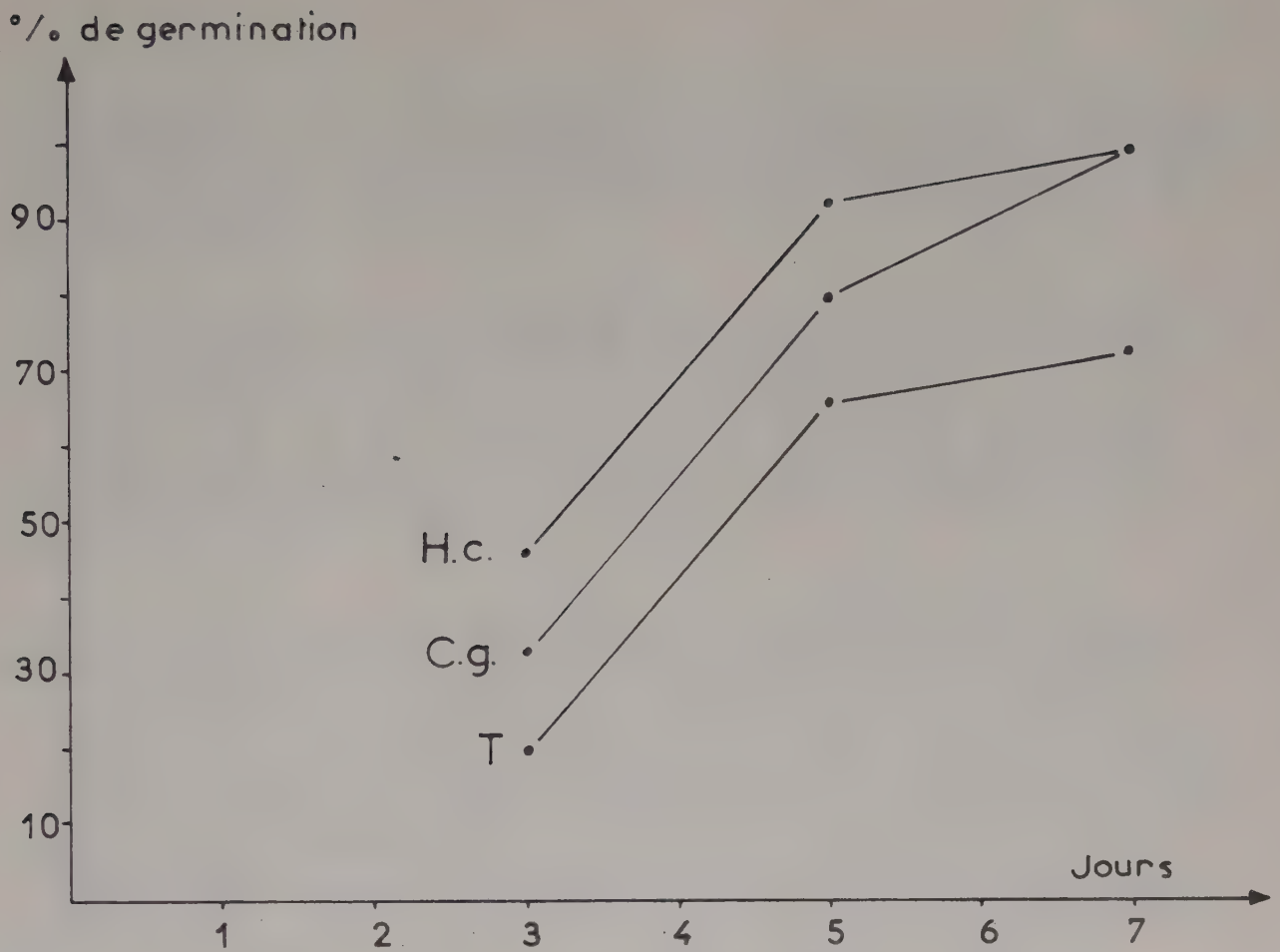
V - DISCUSSION ET CONCLUSION -

"La non- régénération d'une essence sous elle-même est un phénomène bien connu des forestiers : dans les Vosges, elle affecte surtout le Sapin ; en Allemagne, l'Epicéa ; dans le Jura, deux essences au moins présentent des difficultés de régénération : le Sapin et l'Epicéa" rappelle R.MOREAU (1968), qui fait le point de cette question et cite une abondante bibliographie. Dans les cas les plus favorables, on assiste à une alternance des générations, sinon il n'y a pas de régénération du tout. Si, dans la plupart des cas on se contente d'explications vagues (par exemple "la fatigue des sols"), quelques chercheurs ont entrepris d'attaquer la question sous un angle plus scientifique :

TABLEAU XVII

% de germination d'Epicéa sur des cultures de Champignons mycorrhiziens					
Champignon	Jours			Poids mg	Longueur cm
	3	5	7		
<i>C. graniforme</i>	33,3	80	100	3,1	9,4
<i>H. crustuliniforme</i>	46,6	93	100	3,2	9,4
Témoin (malt gélosé)	20	66,6	73,3	2,8	8,6

(Fig. 13)



Germination des graines d'Epicéa sur des
cultures de C.graniforme et H.crustiliniforme.

- du point de vue pédologique, DUCHAUFOUR et ROUSSEAU (1959) avaient constaté un effet toxique du manganeuse sur les plants vosgiens, mais MOREAU (1968) n'a pas pu confirmer ces résultats pour des sapinières et pessières jurassiennes.

- du point de vue de la microflore du sol, la volumineuse étude de MOREAU (1968) conduite il est vrai, par les méthodes classiques de la microbiologie du sol, ne semble pas avoir donné à son auteur des résultats satisfaisants : "il ressort de ces faits que l'étude de la micropopulation de ces sols et de ces rhizosphères n'a pas fourni d'éléments suffisants pour conclure sur la régénération des forêts de Sapins" (OP cit. p. 277).

- la voie la plus prometteuse nous paraît être celle empruntée par quelques chercheurs qui ont pensé à une toxicité du sol, toxicité pouvant être due aux excréments racinaires ou à un effet inhibiteur de la litière. Il semble que la première hypothèse doive être rejetée : ROUSSEL (1946) n'a pas constaté d'effet inhibiteur du sol dans la zone des racines. De même BAUTZ (1953) a remarqué que plusieurs germinations successives sur un même milieu ne permettaient pas de mettre en évidence une substance inhibitrice ou au contraire activante d'origine racinaire, sur la germination de l'Epicéa. Au contraire, en ce qui concerne la litière d'Epicéa, BUBLITZ (1953) et WINTER et BUBLITZ (1953) ont montré que l'extrait de celle-ci inhibait la germination des graines d'Epicéa en même temps que le développement de la microflore tellurique. Nous avons constaté de même cet effet inhibiteur et, au risque de nous répéter, nous croyons pouvoir dire que la première et principale cause de la non-régénération de l'Epicéa est l'impossibilité des graines de germer sur la litière pure de cette essence.

D'une façon générale, la littérature ne rapporte pas assez d'observations détaillées des zones où la régénération a lieu et de celles où elle est absente : on se contente généralement de décrire le couvert végétal par la strate arborescente, la strate herbacée aussi, là où elle est remarquable. On sait ainsi que les hautes herbes de la megaphorbiaie empêchent la régénération (MOREAU, 1968 - BOULLARD 1959).

La présence de petits semis naturels sur les vieilles souches en décomposition est également bien connue, mais ce n'est que très rarement que l'on précise la nature exacte de la couverture du sol : litière pure ou strate muscinale. Cependant, BOULLARD (1959) a observé une bonne régénération de l'Epicéa liée à une mycorrhization satisfaisante dans des zones recouvertes des Mousses dont la position taxinomique n'est malheureusement pas précisée. Cet auteur, à la

suite de DIMBLEBY (1953, cité par BOULLARD 1959) tout comme HANDLEY (1963) lie ainsi régénération et facteurs biologiques ; plus précisément la symbiose mycorrhizienne s'établit le plus intensément dans les zones où la régénération naturelle est la meilleure. Comme le montre le paragraphe III de ce chapitre, nos observations in situ et nos expériences au laboratoire semblent être en accord avec les résultats de BOULLARD (loc. cit.) : la régénération se produit dans les régions à Mousse et s'accompagne d'une bonne mycorrhization. Elle n'a pas lieu dans les zones à Graminées ni, dans le cas de nos stations, sur litière pure d'Epicéa.

Quant à nos essais in vitro concernant la litière d'Epicéa ou ses extraits, ils confirment les observations antérieures de RUBLITZ ; il serait intéressant de déterminer la cause chimique précise de cette toxicité et d'en étudier l'évolution lors de la décomposition de la litière. De même pour les Graminées et pour l'Hépatique *P. asplenoides*, la cause de la non-régénération mériterait d'être précisée.

Bien entendu, nous sommes conscients du fait que cet essai d'étude du problème de la régénération de l'Epicéa pose plus de questions qu'il n'en résoud. C'est ainsi qu'à Gondreville, nous n'avons pu observer que de jeunes semis d'environ un an mais pas d'arbustes de quelques années. Nous pensons seulement avoir établi les points suivants :

- il y a germination des graines et début de croissance des plantules, au niveau des tapis de la Mousse, *P. purum*.

- cette croissance s'accompagne d'une bonne mycorrhization où le pourcentage de mycorrhizes noires à *C. graniforme* n'est pas trop élevé.

Nous confirmons donc dans le cas de *P. abies*, la stimulation de la mycorrhization par *P. purum* observée chez le Pin sylvestre par KILBERTUS et MANGENOT (1971).

De même, nous croyons légitime d'inclure une étude de la régénération dans un travail consacré à la mycorrhization en raison des liens évidents entre ces deux phénomènes, liens déjà constatés par BOULLARD (1959, 1961, 1962) et que nous confirmons. Parmi les autres problèmes restant posés, on pourrait citer encore :

CONCLUSION GENERALE

Le travail dont nous venons de présenter les résultats constitue notre participation à un programme d'étude de la symbiose mycorrhizienne. Dans ce cadre, il nous avait été demandé :

- de mettre au point des méthodes de culture axénique et de synthèse ;

- d'étudier les mycorrhizes formées par l'Epicéa en conditions naturelles ;

Dans la première partie, nous décrivons les essais et nous présentons les résultats qui nous ont conduits à adopter une méthode standardisée pour :

- le traitement, la stérilisation superficielle et la mise en germination des graines ;

- la culture en milieux convenables, des Champignons et des plantules ;

- les synthèses.

Nous avons pu ainsi obtenir la formation de mycorrhizes en conditions axéniques avec quatre Champignons et en conditions semi-axéniques avec deux d'entre eux.

Nous n'avons jamais constaté qu'un Champignon mycorrhizien parasitait une plantule, même très jeune, d'Epicéa ; chez les Pins, d'autres auteurs ont montré que les plantules ne supportent pas l'inoculation avant un certain stade de développement correspondant à peu près à l'émission des racines latérales. Chez *Picea*, les graines peuvent germer sur un substrat déjà envahi par le Champignon ; nous avons choisi, pour tous nos essais de synthèse, de repiquer les jeunes plantules après une semaine de germination.

Nous décrivons ensuite les mycorrhizes de deux plantations d'Epicéa : quantité absolue, variation en fonction de la saison, de la profondeur et de la litière, types classés d'après le système de DOMINIK. Deux résultats nous paraissent importants :

- toutes les racines courtes sont mycorrhisées (dans les échantillons analysés) ;

- les complexes dûs à *Cenococcum graniforme* deviennent plus abondants en conditions défavorables sol pauvre et calcaire, mauvaises conditions culturales, litière toxique. Le même Champignon est peu affecté par les conditions climatiques et par la profondeur des racines.

De même *Cenococcum graniforme* devient prédominant dans le sol de Gondreville, mais aussi dans celui de la Sivrite additionné de Ca CO_3 , chez des plantules cultivées en fioles, dans des sols non stériles.

Ces essais nous montrent aussi que des symbiontes mycorrhiziens sont présents dans tous les sols forestiers étudiés, mais absents de deux sols agricoles. La croissance des plantules est toujours sensiblement proportionnelle au nombre de mycorrhizes formées.

Ayant constaté dans nos stations la présence de jeunes semis d'Epicéa sur des tapis de Mousse, alors qu'ils sont absents sur la litière d'aiguilles, nous avons réalisé au laboratoire quelques essais pour tenter d'expliquer ce phénomène : les graines ne peuvent pas germer sur litière ; l'extrait de *Ps. purum* accélère la germination tandis que l'extrait de litière, à la concentration utilisée, réduit la taille des racines des plantules. Après séparation des différentes fractions de l'extrait de Mousse, nous avons constaté que la fraction neutre, contenant les sucres, stimulait la germination comme le fait l'extrait total.

BIBLIOGRAPHIE

BAUTZ E. (1953). - Einwirkung verschiedener bodentypen und bodenextrakte auf keimung von *Picea excelsa*.

Zeitsch. für Bot., 41, 41-84.

BECKFR M. (1972). - Formations forestières potentielles. (In : GURY M. , Carte pédologique du plateau de Haye, pp. 39-42).

C.N.R.S., Univ. NANCY I, 46 p.

BJORKMAN E. (1961). - The influence of ectrophic mycorrhize on the development of forest tree plants after planting.

IUFRO - Kongress Wien.

PJORKMAN E. (1970). - Forest tree mycorrhizes. The condition for its formation and the significance for tree growth and afforestation.

Pl. sail 32 (3), 589-610.

BOULLARD B. (1959). - Importance des mycorrhizes pour la régénération de l'Epicéa.

Rev. Soc. Forest., Franche-Comté et Prov. Est 30, 1-11.

BOULLARD B. (1961). - Importance des mycorrhizes pour la régénération de l'Epicéa (*Picea excelsa* Link).

Bull. Soc. Forest. de Franche-Comté et des Prov. de l'Est, 31, 245-254.

BOULLARD B. (1962). - Importance des mycorrhizes pour la régénération de l'Epicéa. III - Pratiques favorables à la mycorrhization des plants.

Bull. Soc. Forest. de Franche-Comté et des Prov. de l'Est, 32, 481-487.

BOULLARD B. (1964). - Acquisitions récentes relatives à l'écologie des mycorrhizes.

Journ. d'agric. tropic. et de Bot. appliqu.
T XI, 12, 515-542.

BOULLARD B. et DOMINIK T. (1966). - Les associations mycorrhiziennes dans les hêtraies françaises. II - Un exemple de *Fagetum gallicum*. Pl., la hêtraie relictuelle de la Sainte-Baume.

Bull. du Mus. Hist. Nat. Marseille, 26, 5-19.

BOULLARD B. (1968). - Les mycorrhizes.

Paris, Masson, 135 P.

PUBLITZ W. (1953). - Über die Keimhemmende Wirkung der Fichtenstrau.

Naturwiss, 40, n°9, 275-276.

DAVEY C.B. (1969). - Non pathogen organisms associated with mycorrhizae.

Proc. 1st. N. Am. Conf. Mycorr., USDA, 114-121.

DECOURT M. et LE TACON F. (1970). - L'Epicéa commun (*Picea excelsa*) sur les plateaux calcaires de l'Est de la France. Essai de prévision de la production à l'aide de déterminations pédologiques simples.

Ann. Sci. Forest. , 27 (3), 255-286.

DELON R. (1970). - Etude du comportement de Champignons au niveau de racines de Betterave (*Beta vulgaris*).

D.E.A. Agronomie, Faculté des Sciences de Nancy.

DOMINIK T. (1969). - Key to ectotrophic mycorrhizae.

Folia forest. palon., A, 15, 309-321.

DOMMERGUES Y. et MANGENOT F. (1970). - Ecologie microbienne du sol.

Paris, Masson, 796 P.

DUCHAUFOUR Ph. et ROUSSEAU L.Z. (1959). - Les phénomènes d'intoxication des plantules des résineux par le manganèse dans les humus forestiers.

Rev. Forest. Franç., 11, n°12, 835-847.

FANTANA A. et CENTRELLA E. (1967). - Ectomicorrize prodotte da funghi ipogei.

Allionia 13, 149-76.

FORTIN J.A. et PINEAU M. (1971). - L'inoculation mycorrhizienne dans la production des plants forestiers.

Forest. Chronicle n°2.

GAUDRAY D. (1972). - Etude de la symbiose mycorrhizienne chez quelques résineux : Morphologie, anatomie, analyses et synthèses.

Thèse Doctorat de 3ème Cycle, Fac. Sci. Rouen, 105P.

GRETE J. et CHEVALIER G. (1973). - Recherches en vue d'une trufficulture rationnelle. Aspects mycologiques.

B.T.I. 283, 733-744.

GUITTET J. et LABERGE J.C. (1972). - L'implantation naturelle du Pin sylvestre sur pelouse xérophile en forêt de Fontainebleau. I - Description de la station de la plaine de la Salle et programme des recherches.

Bull. Soc. Ecol., t. III, 4, 435-447.

GURY M. (1972). - Carte pédologique du plateau de Faye. Notice explicative.

C.N.R.S. Univ. NANCY I, 46P.

FACSKAYLO E. (1953). - Pure culture syntheses of Pine mycorrhizae in terra-lite.

Mycologia, 45, 971-975.

HANDLEY W. (1963). - Mycorrhizal associations and Calluna heathland afforestation.

Forestry commission, Bull. 36, 70P.

FARLEY (1959). - The Biology of mycorrhiza.

London, Leonard Hill Books Co., 334 P.

JACAMON M. Cours de Botanique forestier - Dendrologie.

E.N.G.R.E.F. NANCY.

- KIFFER E. (1974). - Etude des Champignons mycorrhiziens et de quelques autres souches associées à l'Epicéa en Lorraine.
Thèse Spécialité, Université NANCY I.
- KILBERTUS G. et MANGENOT F. (1972). - Influence d'un tapis de Mousses sur la mycorrhization de *Pinus sylvestris*.
Oecol. Plant., 7, 79-87.
- KILBERTUS G. (1973). - Etude écologique de la strate muscinale dans une pinède sur calcaire lusitanien en Lorraine.
III. P.B.I., RCP 40, écologie du sol.
- LACAZE J.F. (1969). - Etude de la variabilité infraspécifique de l'Epicéa.
Ann. Sci. forest., 26 (3), 345-396.
- LAIHO O. (1970). - *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees.
Acta forestalia Fennica, Vol. 106.
- LINFELL D. (1942). - *Cenococcum graniforme* als mykorrhizabildner von Waldbaumen.
Symb. Bot. Upsaliensis, 5, 1-18.
- MALLOCH D. et BENNY G. (1973). - California Ascomycetes four new species and a new record.
Mycologia, 65 (3), 648-660.
- MARX D.F. et ZAK B. (1965). - Effect of pH on mycorrhizal formation of slash pine aseptic culture.
Forest. Sci., 11, 66-75.
- MARXS G.C. et NELL D. et FOSTER R.C. (1968). - Quantitative estimates of mycorrhiza population in Radiata Pin forests.
Austr. forest., 32 (1), 26-38.
- MARX D.F. (1969). - The influence of ectotrophic mycorrhizal fung on the resistance of Pine rootes to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria.
Phytopathology, 59, 153-163.

MARX D.F. (1969)_b. - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of Pine roots to pathogenic infection. II. Identification, production, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *Piceina*.

Phytopathology, 59, 411-417.

MARX D.F. et DAVEY C.P. (1969)_a. - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of Pine roots to the pathogenic infection. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Phytopathology, 59, 549-558.

MARX D.F. et DAVEY C.B. (1969)_b. - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of Pine roots to pathogenic infection. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*.

Phytopathology, 59, 559-565.

MARX D.F. et ROSS E.W. (1970). - Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*.

Can. J. Bot., 48 (1), 197-8.

MARX D.F. (1973). - Growth of ectomycorrhizal and non mycorrhizal shortleaf Pine seedlings in soil with *Phytophthora cinnamomi*.

Phytopathology, 63, 18-23.

MELIN E. (1923). - Experimentelle untersuchungen uber die Konstitution und Ekologie der Mykorrhizen von *Pinus sylvestris* und *Picea abies*.

Mykologische untersuch, 2, 73-331.

MELIN E. (1923). - Experimentelle untersuchungen uber die Konstitution und Ekologie der mycorrhizen von *Pinus sylvestris* und *Picea abies*.

Mykologische untersuch 2, 73-331.

- MELIN E. et NORKRANS B. (1948). - Amino-acids and the growth of *Lactarius deliciosus* (L.) fr.
Physiol. Plant., Danem., 1, 174-184.
- MEYER F.F. (1964). - The role of the fungus *Cenococcum graniforme* Ferd. et winge in the formation of mor.
In : Jongerius A. (Ed.)
Soil micromorphology, pp. 23-31
Elsevier, Amsterdam.
- MIKOLA P. et LAIFO O. (1962). - Mycorrhizal relation in the rais-humus layer of northern spruce forests.
Comm. Inst. For. Fenn., 55, 18.
- MIKOLA P. (1969). - Afforestation of treeless areas.
Unasylva, Vol. 23 (1), 35-47.
- MOREAU R. (1968). - Recherches sur les relations entre la microflore et le peuplement végétal de sols jurassiens et alpins. Applications aux forêts.
Thèse de Doct. es-Sciences naturelles, Fac. Sci. Univ. CAEN.
- MOSER M. (1958)_a. - Die Kunstlich mykorrhizampfung an forstplanzen.
Forstw Cbl, 77, 1-64.
- MOSER M. (1958)_b. - Die Kunstlich mykorrhizampfung an forstplanzen. II. Die torfstreukultur von mykorrhizapflanzen.
Forstw Cbl, 77, 257-320.
- MOUZAIN D. (1971). - Essai d'analyse de la symbiose ectomycorrhizienne chez le Pin maritime.
Acad. Montpellier, Univ. Sci. Tech. du Languedoc 236P.
- PACHLEWSKA J. (1968). - Badania nad synteza mikoryzowa sosny (*Pinus sylvestris*, L.) wszystkich kulturach na agarze.
Prace Inst. Badawcz. leśn., 345, 3-76.

- PACHLEWSKI R. (1973). - Quelques remarques concernant les recherches sur les mycorrhizes ectotrophes du Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et sur les Champignons de celles-ci.
- Rev. de mycologie, T. XXXVII, fasc. 1-2.
- PARK J.Y. (1970). - A change in colour of aging mycorrhizal roots of *Tilia americana* formed by *Cenococcum graniforme*.
- Can. J. Bot., 48 (7), 1339-41.
- PIUSSI P. (1970). - Indagini sull'ecologia dei semenzali di *Picea*.
- Giron. Bot. Ital., 104, 193-214.
- PIUSSI P. et SULLI A. (1972). - La germination del seme di pecea nel quadro della rinnovazione della pecceta.
- Informatore botanico Italiano, Vol. 4, n°2, 160-164.
- RICHARD C. et FORTIN J.A. (1970). - Les mycorrhizes de *Picea mariana* (Mill) BSP. Aspects morphologiques, anatomiques et systématiques.
- Naturalist Can., 97, 163-173.
- SUGGS E.G. et GRAND L.F. (1972). - Formation of mycorrhizae in monoxenic culture by pond pine (*Pinus serotina*).
- Can. J. Bot., 50, 1003-1007.
- TFOEN D. (1970). - Une technique d'identification des mycorrhizes par chromatographie sur couche mince.
- Rev. Mycol. Fr., 35 (4), 258-264.
- TRAPPE J.M. (1961). - Strong hydrogen peroxide for sterilizing coats of tree seed and stimulating germination.
- J. forest., U.S.A., 59, (11), 828-829.
- TRAPPE J.M. (1962). - Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae.
- Bot. Rev., 28, 538-606.

TRAPPE J.M. (1962). - *Cenococcum graniforme*, its distribution ecology, mycorrhiza formation and inherent variation.

Ph.D. Univ. Washington, 148P.

TRAPPE J.M. (1964). - Mycorrhizal hosts and distribution of *Cenococcum graniforme*.

Lloydia , 27, 100-106.

TRAPPE J.M. (1969). - Studies on *Cenococcum graniforme*. I. An efficient method for isolation from sclerotia.

Can. J. Bot. , 47, 1389-1390.

VENET J. La Lorraine

E.N.G.R.E.F. NANCY

WILD S.A. et LAFOND A. (1967). - Symbiotrophy of lignophytes and fungi : its terminological and conceptual deficiencies.

Bot. Rev. 33 (2), 99-104.

WINTER A.G. et BUEBLITZ W. (1953). - Untersuchungen uber antibakterielle wirkungen im bodenwasser der fichenstreu.

Naturwiss, 40, n° 12, 345-346.

WINTER A.G. et SCHONBECK F. (1953). - Untersuchungen uber die einfluss von kalt wasserextrakten aus getreidestroh und anderer blattstreu auf wurzelbildung und wachstum.

Naturwiss, 40 , n° 19, 513-514.

ZAK B. (1964). - Role of mycorrhizae in root disease.

Annu. Rev. Phytopathology, 2, 377-392.

ZAK B. (1969). - Characterization and identification of Douglas-fir mycorrhizae.

Proc. 1st N. Am. Conf. Mycorr., USDA, 38-53.

PLANCHE = 1

CULTURE AXENIQUE EN FIOLES

Plantules de *Picea abies* âgées de deux mois
+ *Tricholoma albobrunneum*. Le mycélium s'est bien développé
à la surface du milieu.

planche 1



PLANCHE 2

Paxillus involutus : synthèse axénique en fioles.

Photo. 1 : Détail d'une portion racinaire

M = mycorrhize

S = sclérote

r. m. = racine mère

Photo. 2 : Aspect général d'une partie du système racinaire mycorrhizé par *P. involutus*.

Photo. 3 : Coupe transversale de mycorrhize formée par *P. involutus*.

Ma = Manteau composé de deux couches

RE = Réseau de Hartig.

planche 2

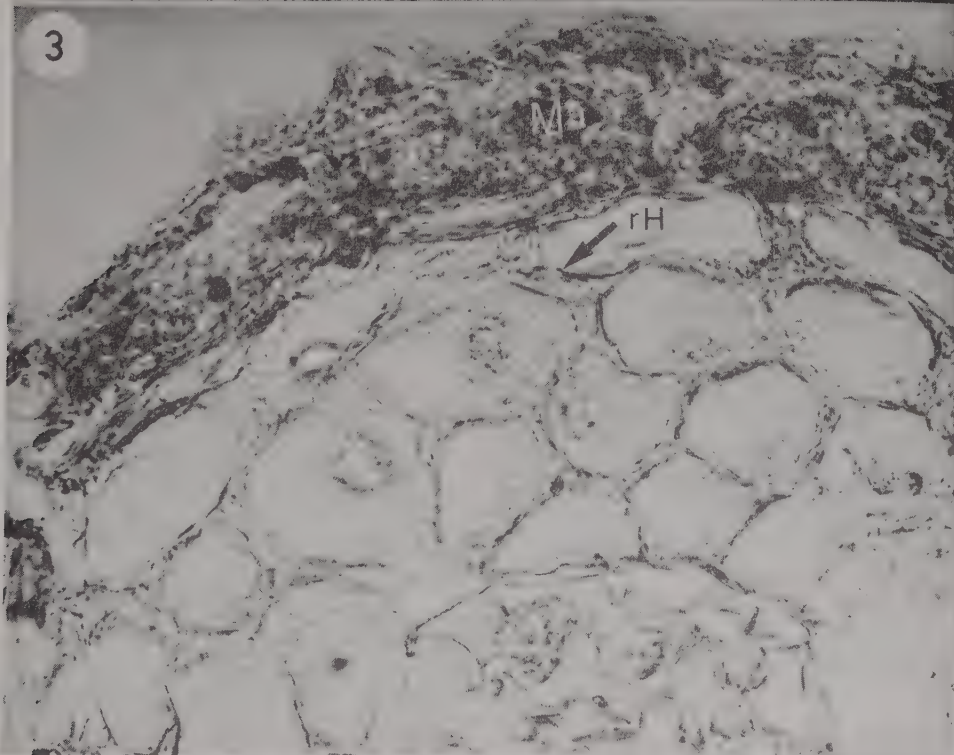
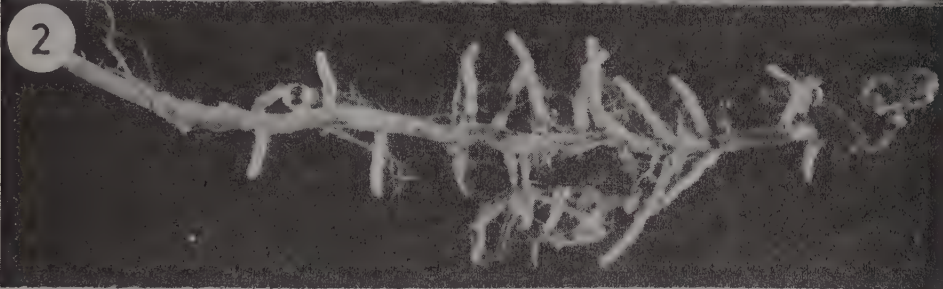


PLANCHE 3

- 1) - Coupe transversale d'une racine infectée par *Paxillus involutus* en culture en tube sur gélose.
- 2) - Coupe transversale d'une racine d'Epicéa âgée d'un mois mycorrhizée par *Cenococcum graniforme* en culture semi-axénique.
- 3) - Coupe transversale d'une racine d'Epicéa âgée de deux mois, mycorrhizée par *Hebeloma crustuliniforme* en culture semi-axénique.
La mycorrhize est dépourvue de manteau.
- 4) - Coupe transversale d'une mycorrhize formée en présence de *Cenococcum graniforme* et *Tricholoma albobrunneum* après quatre mois de culture semi-axénique.

planche 3

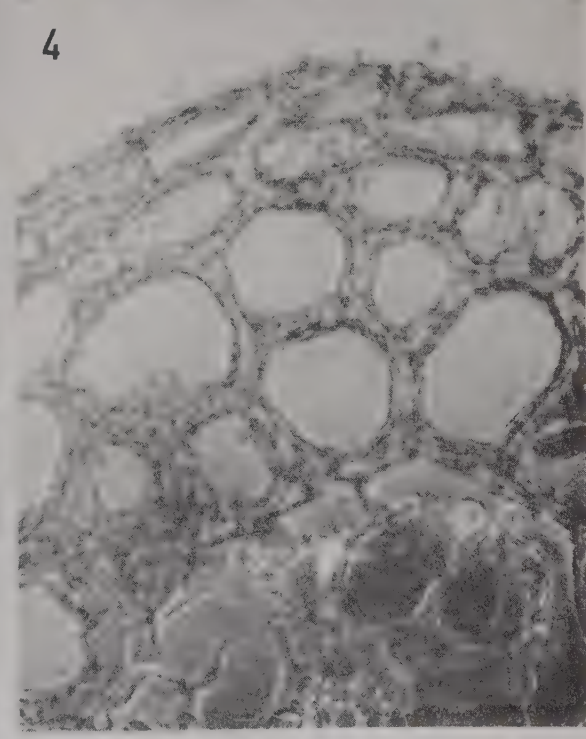
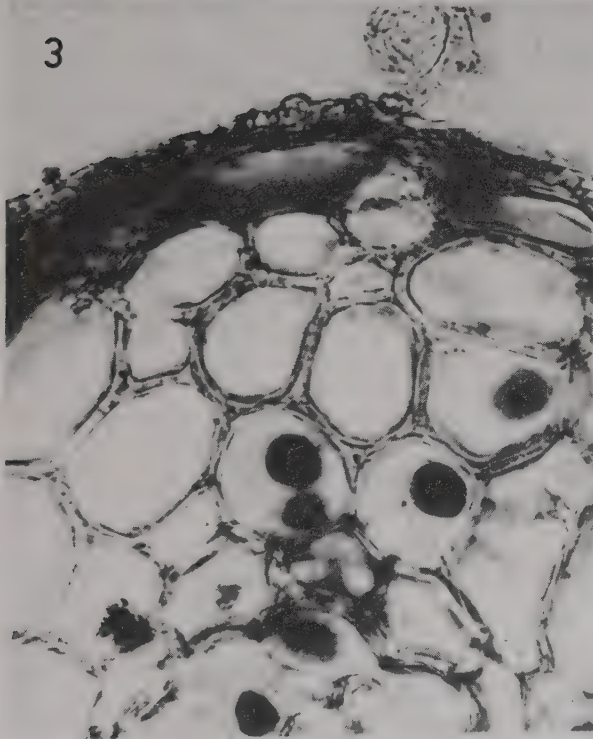
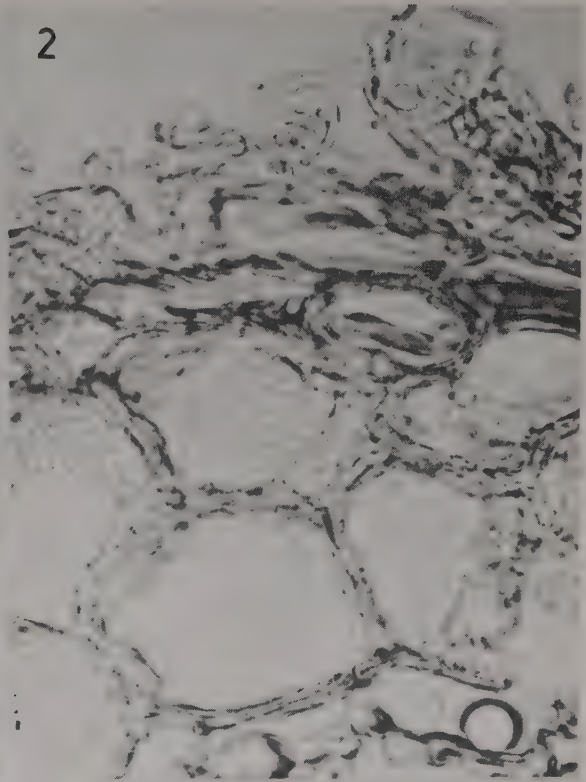
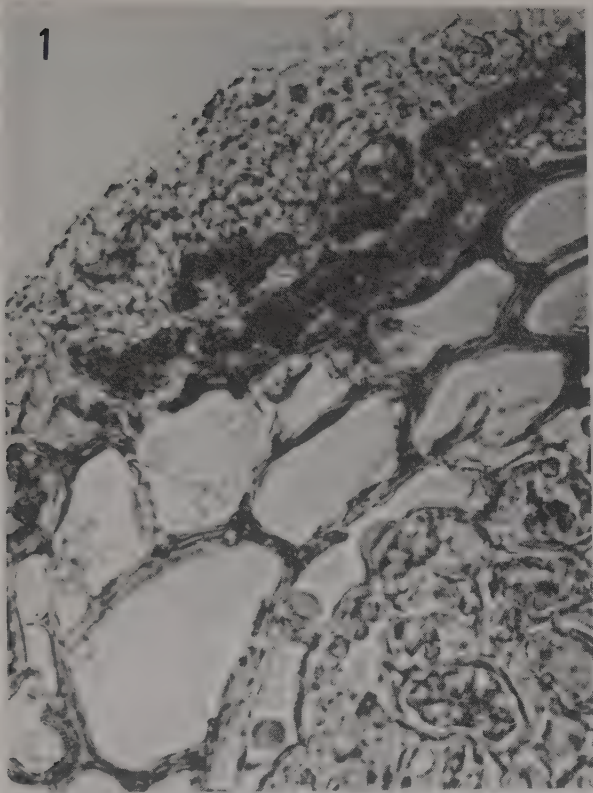


PLANCHE 4

QUELQUES TYPES DE MYCORRHIZES D'EPICEA ADULTES :

macrophotographie

Photo. 1 : Mycorrhizes brun-clair collectées dans la station de la Sivrite.

Photo. 2 : Mycorrhizes brun-clair de la station de Gondreville.

Photo. 3 : Mycorrhizes brun-foncé de la station de Gondreville.

Photo. 4 : Mycorrhizes noires à *Cenococcum graniforme* de la station de la Sivrite ; noter les hyphes du Champignon autour des racines.

planche 4

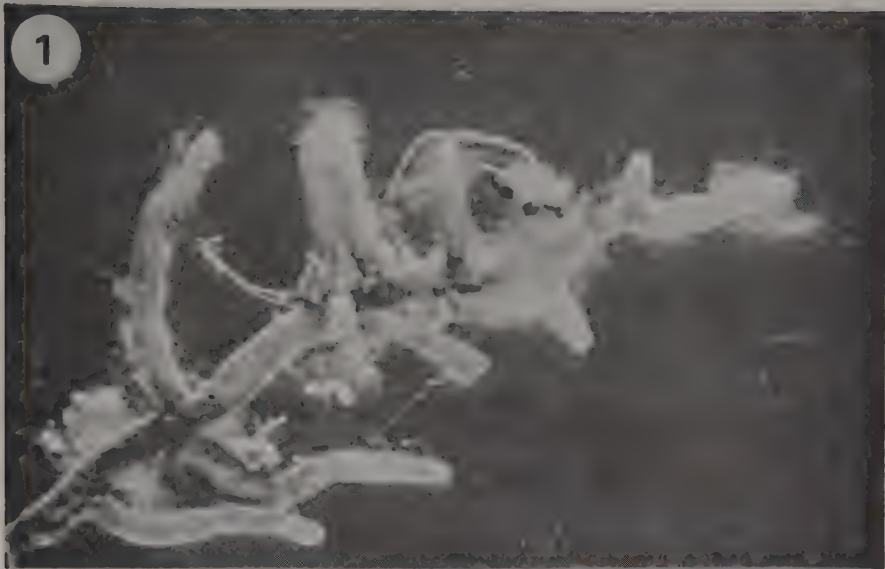


PLANCHE 5

MYCORRHIZES DE LA SIVRITE

Photo._1 : Coupe transversale d'une mycorrhize verte vivante. Le manteau est très épais.

Photo._2 : Coupe transversale d'une mycorrhize brun-foncé, type H.

Photo._3 : Coupe transversale d'une mycorrhize brun-clair, type C.

Photo._4 : Coupe transversale d'une mycorrhize claire.

planche 5

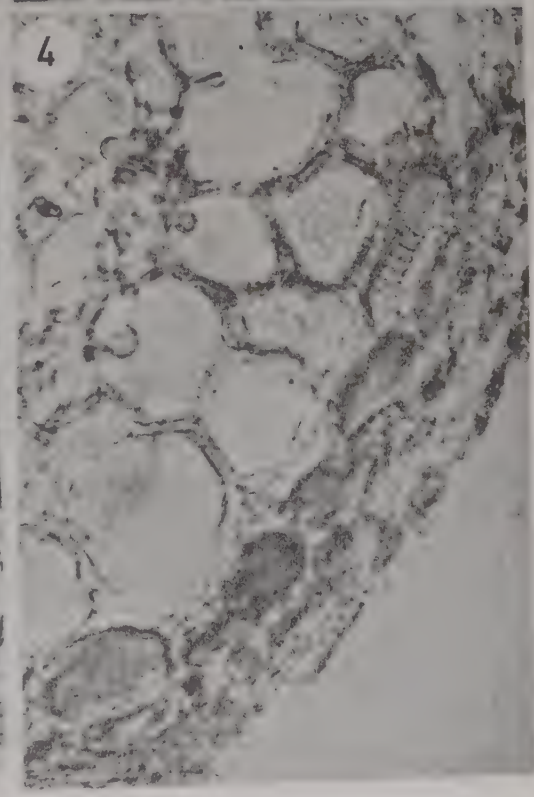
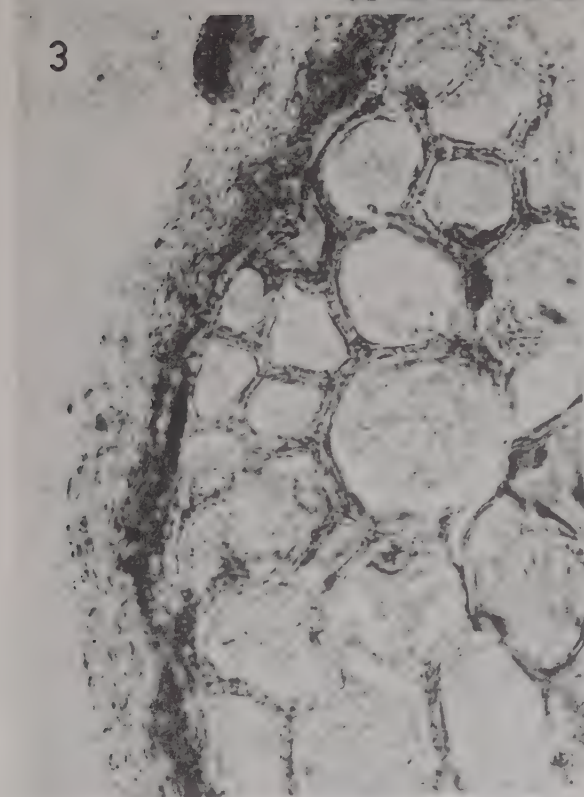


PLANCHE 6

Cenococcum graniforme, MYCORRHIZES ET SCLEROTES, NATURE.

Photo._1 : Coupe transversale d'une racine courte,
la Sivrite.

Photo._2 : Macrophotographie d'un groupe de mycor-
rhizes noires, Gondreville.

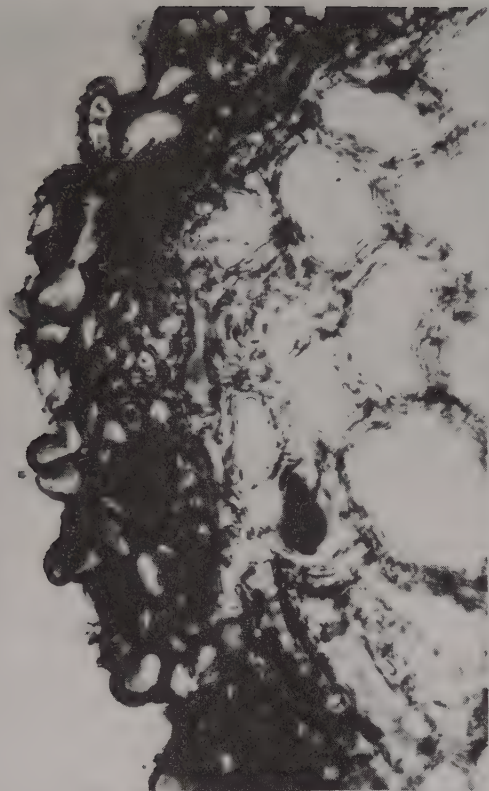
Photo._3 : Détail : mycorrhizes noires et hyphes,
la Sivrite.

Photo._4 : Manteau séparé de la mycorrhize : structure
rayonnante typique.

Photo._5 : Coupe de sclérote.

planche 6

1



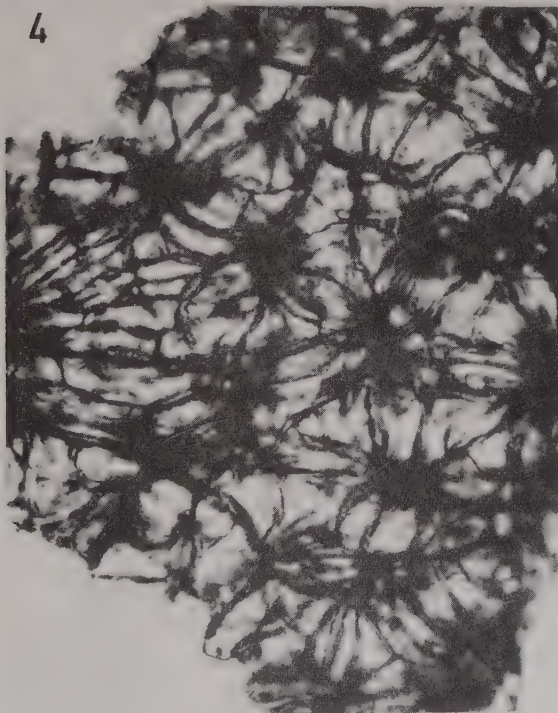
2



3



4



5

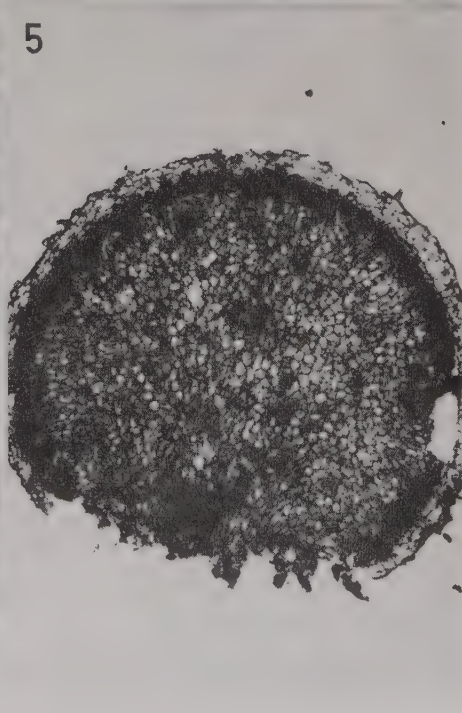


PLANCHE 7

Photo. 1 : Coupe transversale d'une mycorrhize morte.

Photos 2, 3, 4 : Mycorrhizes veloutées de type Ih

photo. 2 : Manteau et réseau de Hartig.

photo. 3 : coupe tangentielle de la lame
fongique au niveau du réseau
de Hartig.

photo. 4 : détail : aspect des soies à la
périphérie du manteau.

planche 7

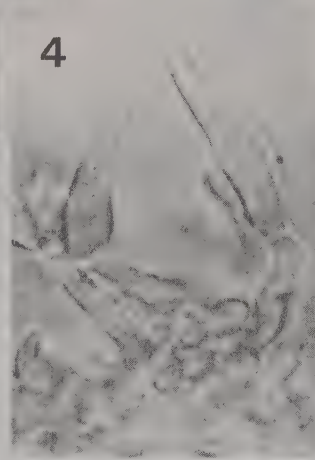
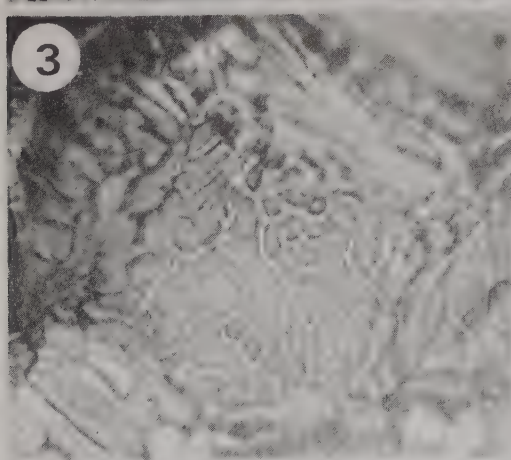
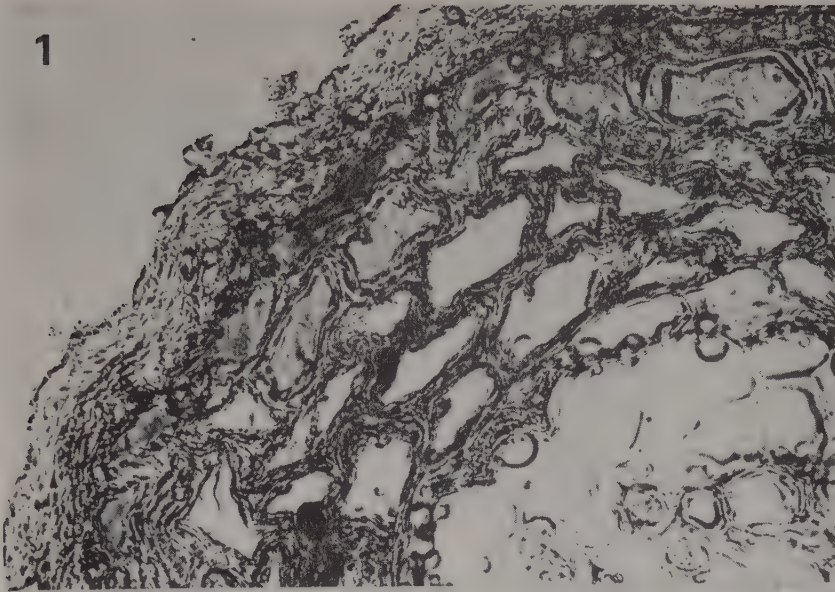


PLANCHE 8

MYCORRHIZES DE GONDREVILLE :

COUPES TRANSVERSALES

- 1) - Mycorrhize brun-foncé, type B
- 2) - Mycorrhize brun clair, type F
- 3) - Mycorrhize claire ; noter l'absence de manteau.

planche 8

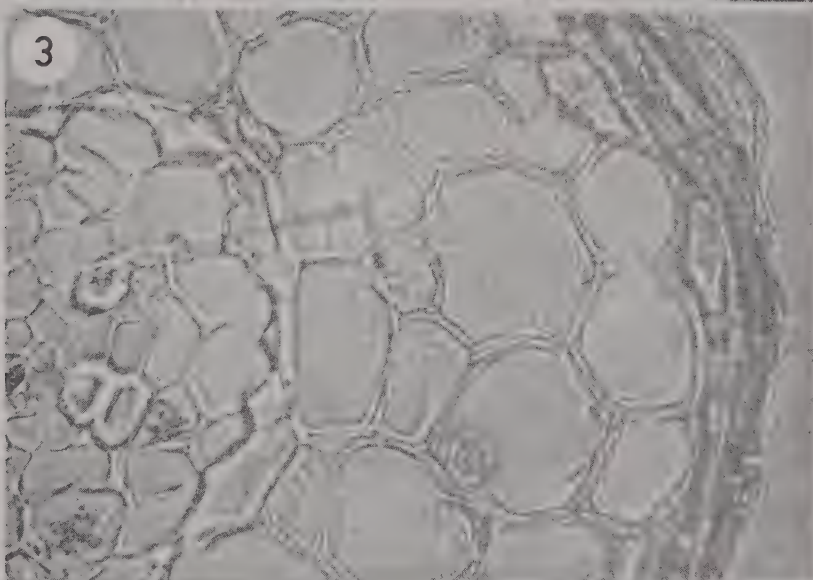
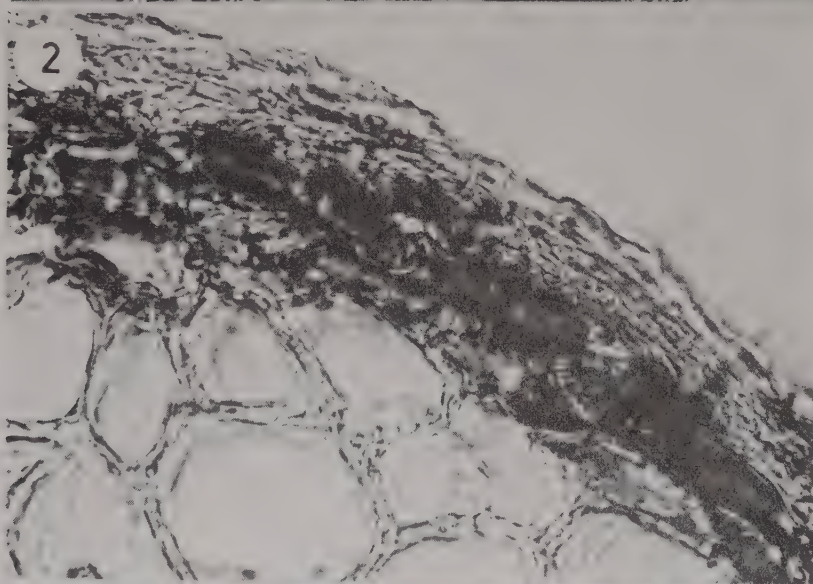
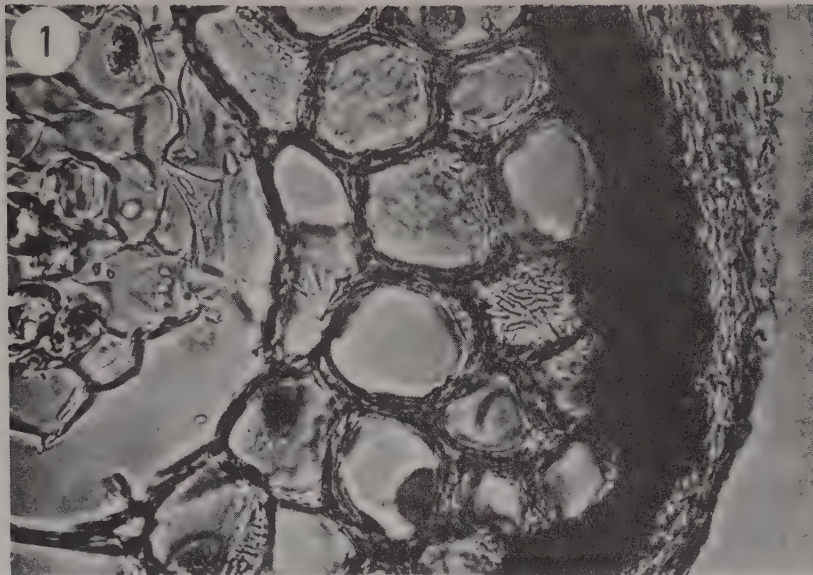
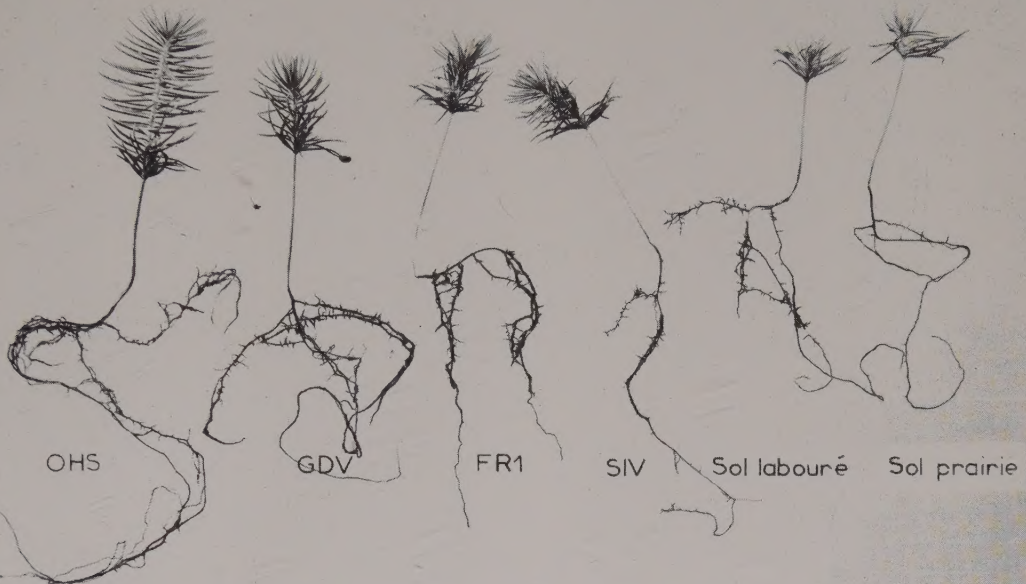


PLANCHE 9

- 1) - Plantules de quatre mois, cultivées dans différents sols.
- 2) - Germination des graines d'Epicéa sur différents substrats (20 jours) : de gauche à droite :
 - litière d'Epicéa, Gondreville : pas de germination.
 - Mousse (*Ps. purum*), Gondreville : 50% de germination.
 - Hépatique (*Pl. asplenioïdes*), pas de germination.

planche 9

1



2



